

**TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE THERAPEUTISCHE BEEINFLUSSUNG
DES VERBRÜHUNGSSCHOCKS DURCH DIE
APPLIKATION VON TRASYLOL, HEPARIN UND
EINES NEUEN POLYVALENTEN
PROTEINASENINHIBITORS AUS SEEANEMONE**

Dieter Spelsberg

1976

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische
Biochemie der Universität München
Komm. Leiter: Prof. Dr.rer.nat. et med.habil. H. Fritz

**TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE THERAPEU-
TISCHE BEEINFLUSSUNG DES VERBRÜHUNGSSCHOCKS DURCH DIE
APPLIKATION VON TRASYLOL, HEPARIN UND EINES NEUEN
POLYVALENTEN PROTEINASENINHIBITORS AUS SEEANEMONE**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dieter Spelsberg
München
1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Fritz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Spiess
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	20. 7. 1976



DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A.	DIE VERBRENNUNGSKRANKHEIT UNTER DEM ASPEKT DER PROTEASENFREISETZUNG UND GERINNUNGSSTÖRUNG	1
1.	PATHOPHYSIOLOGIE DES VERBRÜHUNGSSCHOCKS	3
1.1.	Burn Syndrom	4
1.2.	Lokales Geschehen	5
1.2.1.	Permeabilitätsschädigung der Kapillaren	6
1.2.2.	Strukturelle Grundlage - Angriffspunkte vasoaktiver Stoffe	8
1.2.3.	Mediatoren	10
1.2.3.1.	Typ I: Kinine, Prostaglandine und Histamin	11
1.2.3.2.	Typ II. Proteasen und spezifische Faktoren	12
1.3.	Flüssigkeitsverlust und Hämokonzentration	13
1.4.	Störung der Mikrozirkulation	13
1.5.	Circulus Vitiosus des Schocks	14
1.5.1.	Hyperkoagulabilität	15
1.5.2.	Azidose	15
1.5.3.	Strömungsverlangsamung	15
1.5.4.	Verbrauchskoagulopathie	16
1.5.5.	Hyperfibrinolyse	18
1.5.6.	Proteolyse	20
2.	GESCHICHTE, CHEMIE UND WIRKUNGEN DES KALLIKREIN, DES KININSYSTEMS UND SEINER INHIBITOREN	23
2.1.	Geschichte der Entdeckung des Kallikrein und des Kininsystems	23
2.2.	Chemie des Kallikrein und der Kinine	24
2.3.	Wirkungen des Kallikrein und der Kinine	25
2.4.	Geschichte und Entdeckung des Trasylol	28
2.5.	Chemie des Trasylol	30
2.6.	Wirkungen des Trasylol	32
2.7.	Entdeckung der Proteinase-Inhibitoren aus der Seeanemone Anemonia sulcata	35
2.8.	Isolierung der Proteinase-Inhibitoren aus der Seeanemone Anemonia sulcata	36
2.8.1.	Anreicherung	36

	Seite
2.8.2. Affinitätschromatographie an Trypsin-Cellulose	36
2.9. Chemie und physiologische Wirkung der Proteinasen-Inhibitoren aus der Seeanemone	37
2.10. Verteilung und Ausscheidung von Trasylol im Vergleich zum Seeanemoneninhibitor nach intravenöser Injektion bei der Ratte	40
2.10.1. Methode der Untersuchung	40
2.10.2. Verteilung von Trasylol	41
2.10.3. Verteilung des Seeanemoneninhibitors	43
2.10.4. Vergleich der Verteilung der beiden Inhibitoren	45
3. GESCHICHTE, CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN, PHARMAKOLOGIE UND ANWENDUNG DES HEPARINS	46
3.1. Geschichte und Vorkommen des Heparins	46
3.2. Chemische Eigenschaften	46
3.3. Pharmakologie	47
3.3.1. Wirkung auf Gerinnungsfaktoren	47
3.3.2. Wirkung auf Kinine	48
3.4. Mikrozirkulation und Heparin	48
3.5. Heparin bei Verbrennungen	49
4. PATHOPHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER PROTEINASENINHIBITOREN UND DES HEPARIN IM VERBRÜHUNGSSCHOCK	51
4.1. Proteolytische Fermente	51
4.2. Inhibition proteolytischer Fermente	53
4.3. Wirkung des Heparins	54
4.4. Heparin kombiniert mit Trasylol	55
4.5. Effekte des Trasylol im Experiment	56
B. VERBRÜHUNGSSCHOCKMODELL, EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	59
1. DAS VERBRÜHUNGSSCHOCKMODELL	59
1.1. Versuchstiere	61
1.2. Haltung und Fütterung der Tiere	61
1.3. Vorbereitung der Tiere für den Versuch	62
1.4. Versuchsbeschreibung	63
2. DURCHFÜHRUNG DER VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCHE	65

3.	I. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH Heparin / Trasylol	67
3.1.	Methodik	68
3.2.	Resultate	69
3.3.	Statistik	69
3.4.	Graphiken	71
	"	72
4.	II. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH Heparin und Trasylol / Heparin	73
4.1.	Methodik	73
4.2.	Resultate	74
4.3.	Statistik	75
4.4.	Graphiken	76
	"	77
5.	ZUSAMMENFASSUNG DER HEPARIN-VERSUCHE	78
5.1.	Graphik	80
6.	III. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH Seeanemoneninhibitor / Trasylol	81
6.1.	Methodik	82
6.2.	Resultate	83
6.3.	Statistik	84
6.4.	Graphiken	85
	"	86
7.	IV. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH Seeanemoneninhibitor / Trasylol	87
7.1.	Methodik	87
7.2.	Resultate	87
7.3.	Statistik	89
7.4.	Graphiken	90
	"	91
8.	ZUSAMMENSTELLUNG DER SEEANEMONENINHIBITOR- VERSUCHE	92
8.1.	Graphiken	93
	"	94
9.	V. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH Trasylol / Ringerlösung	95
9.1.	Methodik	95

	Seite
9.2. Resultate	96
9.3. Statistik	97
9.4. Graphiken	98
"	99
"	100
10. HISTOLOGIE	101
10.1. Material und Methode	101
10.2. Begründung der Methode	103
10.3. Parameter der histologischen Beurteilung	104
10.4. Ergebnisse	104
10.4.1. Lunge	104
10.4.2. Niere	106
10.4.3. Leber	107
10.5. Zusammenfassung	110
11. DISKUSSION	111
11.1. I. Versuch: Heparin / Trasylol	111
11.2. II. Versuch: Heparin und Trasylol / Heparin	114
11.3. III. und IV. Versuch: Seeanemoneninhibitor / Trasylol	117
12. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN	122
13. LITERATURVERZEICHNIS	124

Aufgabe unserer Untersuchungen war es, die therapeutische und prophylaktische Wirkung verschiedener neuartiger Proteinaseinhibitoren und von Heparin im Vergleich zum bekannten Proteinaseinhibitor Trasylol anhand der Überlebenszeit und Überlebensrate von Ratten zu vergleichen, bei denen durch eine standardisierte Verbrühung ein akuter Schockzustand induziert wurde.

Außerdem wurde noch eine histologische Untersuchung von Niere, Leber und Lunge vorgenommen, um hier eventuelle Veränderungen durch Proteinaseinhibitoren festzustellen.

Sämtliche Experimente wurden von cand. med. G. Kwiecinski und mir im Rahmen einer Arbeitsgemeinschaft vorgenommen und die Ergebnisse nach Abschluß der Untersuchungen in zwei Themengebiete getrennt.

G. Kwiecinski vergleicht die Proteasenwirkung von Trasylol, Helicin und Leupeptin im Verbrühungsschock. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Wirkung von Heparin (Liquemin) allein und in Kombination mit Trasylol sowie ein neuartiger Seeanemonen-Proteinaseinhibitor im Vergleich zu Trasylol geprüft.

A.

DIE VERBRENNUNGSKRANKHEIT UNTER DEM ASPEKT DER PROTEASEN-
FREISETZUNG UND GERINNUNGSSTÖRUNG

Viel Neues wurde auf dem Gebiet der Versorgung von Verbrennungskranken in der Zeit kurz vor und während dem zweiten Weltkrieg und in den Jahren danach erarbeitet.

Wenn auch in der örtlichen und allgemeinen Behandlung dieser Unfallerkkrankung kein einheitlich gültiger Weg bisher erreicht wurde, so konnte doch eine bestimmte Richtung gewiesen werden.

Mehrfache Wege sind beschreitbar und bringen Erfolg; denn kaum eine andere Verletzung ruft derart mannigfache und von Fall zu Fall wechselnde lokale und allgemeine Störungen hervor, wie eine Verbrennung. Grundsätzlich sollte die Schwere einer Verbrennung als Maßstab dienen.

Seit den Arbeiten von COPE, EVANS, MOORE und MOYER in den Jahren von 1940 - 1950 wurde erstmals von einer Verbrennungskrankheit gesprochen und die Verbrennungstherapie in örtliche und allgemeine Maßnahmen unterteilt. In der Wertigkeit sind unbedingt beide gleichzusetzen, auch wenn in den verschiedenen Phasen des Krankheitsablaufes diese oder jene Maßnahmen vorrangig erscheinen.

Der Ablauf der Verbrennungskrankheiten ist ein sehr komplexes Geschehen, dafür spricht auch der klinische Verlauf.

MOORE wählte bei seiner Einteilung deskriptive Begriffe, um das zu kennzeichnen, was klinisch im Vordergrund steht. Er unterscheidet vier Phasen:

Die erste Phase wird bestimmt vom
Verbrennungsödem (3. - 4. Tag),

die zweite Phase von der groß-
flächigen Wunde (1. - 3. Woche),

die dritte Phase vom Übergang der
katabolen in die anabole Stoff-
wechsellage (3. - 4. Woche) und

die vierte Phase von der Normalisierung
und Rehabilitation.

Doch diese Einteilung reicht noch nicht um die Komplexi-
tät zu verdeutlichen:

Schon in den ersten Stunden nach dem Trauma bilden sich
zahlreiche Regulationsstörungen aus, die nicht nur auf
einen Volumenverlust zurückzuführen sind, sondern z.B.
auch auf massive Eiweißverluste durch die Freisetzung
von Proteinasen.

Bedeutsam ist nun die Frage, ob es therapeutisch möglich
ist, die Freisetzung solcher Proteinasen wirksam zu hem-
men. Deshalb suchen verschiedene Forschergruppen ständig
nach neuen wirkungsvollen Proteinaseninhibitoren.

Begonnen hat es 1927 mit der Entdeckung des FREY-Inhibi-
tors, später Trasylol genannt, durch WERLE, KRAUT und FREY.

In den letzten Jahren konnten durch intensive Forschung
weitere Inhibitoren isoliert werden. FRITZ und WUNDERER
isolierten aus Seeanemone (*Anemonia sulcata*) und TSCHESCHE
und DIETL aus Weinbergschnecken (*Helix pomatia*) Inhibito-
ren, deren Eigenschaften denen des bisher einzigen thera-
peutisch einsetzbaren Proteinaseninhibitors Trasylol äh-
neln.

Da im Verlauf einer Verbrennungskrankheit auch massive Ge-
rinnungsstörungen auftreten, wird zusätzlich zur Gabe von
Proteinaseninhibitoren auch die Applikation von Heparin
diskutiert.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, den neuen Inhibitor aus See-
anemone, Trasylol und Heparin im Tierexperiment zu erpro-
ben, die Wirkungen bei der Gabe im Verbrennungsschock zu
objektivieren und die Ergebnisse zu vergleichen.

Zur Voraussetzung für ein Verständnis, welche komplexe Auswirkung und damit entscheidende Wichtigkeit der Freisetzung von Proteinasen zukommt, gehört die genaueste Berücksichtigung der Pathophysiologie der Verbrennungskrankheit.

1. PATHOPHYSIOLOGIE DES VERBRÜHUNGSSCHOCKS

In der Folge von größeren Hautläsionen durch Verbrennungen bzw. Verbrühungen kommt es in der Klinik noch immer zu Todesfällen.

LEVENSON und LUND (118) errechneten für Nordamerika, daß 10.000 Krankenbetten täglich von Verbrennungskranken belegt sind. MOYER (137) schätzt die jährlich in Amerika zur Behandlung von Verbrannten bereitgestellten Betten auf 4 - 6 Millionen.

Trotz dieser großen Patientenzahlen und der sich damit aufzeigenden Gesetzmäßigkeiten im Krankheitsablauf, kommt die Therapie der Verbrennungskrankheit nur mühsam voran.

Während des ersten Weltkrieges waren die Überlebenschancen für Patienten mit 50 %iger Verbrennung der Körperoberfläche sehr gering. Heutzutage erreicht die Überlebensrate 50 % bei Patienten im Alter von 16 - 32 Jahren; zweifellos ein Erfolg der Plasma- und Elektrolytsubstitutionstherapie sowie der Anwendung von Antibiotika.

Wie man den Mortalitätsstatistiken jedoch entnehmen kann, fiel die Todesrate in den letzten 25 Jahren nur um 5 % ab. Viele Forscher glauben deshalb, daß man bei Verbrennungen an einem Endpunkt der Therapiemöglichkeiten angelangt ist (BACK, JAINCHILL und WILKENS).

Wesentliche Fortschritte in der Therapie von Verbrennungsverletzungen wurden erst erzielt, als man erkann-

te, daß die Hautverbrennung nicht nur einen örtlichen Schaden darstellt, sondern eine Wirkung auf den Gesamtorganismus auslöst, den man mit dem Begriff "Verbrennungskrankheit" beschrieb (185).

1.1. Burn Syndrom

Eine durch thermische Überhitzung ausgelöste Gewebeschädigung setzt eine Kettenreaktion krankhafter Vorgänge in Gang, von ARTURSON (3) auch als "Burn Syndrom" bezeichnet. Dieses Syndrom wird vor allem verursacht durch starke Flüssigkeitsverschiebungen qualitativer und quantitativer Art. Die hierbei auftretenden Symptome lassen sich in drei zeitlichen Phasen aufzeigen:

1. Phase

In der ersten Phase, d.h. in den ersten 48 Stunden kommt es durch verletzte Gefäße und einem Ansteigen der Kapillarpermeabilität zu einer starken Flüssigkeitsverschiebung und somit zu einer akuten zirkulatorischen Insuffizienz, wobei das ganze Organsystem betroffen ist. Zahlreiche Organe scheinen gebläht, ödematös und mit zahlreichen Hämorrhagien durchsetzt zu sein. Es kommt zu Lungenödem (176), Nierenrindennekrosen mit Olig- oder Anurien (186), Leberschäden (145, 203), Gastrointestinalulcerationen (34, 42) und Gehirnödem (42, 91).

2. Phase

Am dritten bis achten Tag, also in der zweiten Phase nach der Schädigung, stellen sich durch die bereits bestehende veränderte Körperflüssigkeitsverteilung und -zusammensetzung Eiweiß- und Elektrolytverluste ein. Begleitet durch Infekte entstehen in dieser Phase degenerative Veränderungen an den Organen.

3. Phase

In der dritten Phase, während der zweiten Woche nach der Verbrennung, kommt es zu größeren Organathrophien mit beginnender fibrotischer Reparation vor dem Hintergrund einer Stoffwechselentgleisung, Infektion und allgemeinen Erschöpfung.

Im Rahmen dieser Arbeit beschränken wir uns in der Beschreibung der Pathophysiologie des Verbrühungsschocks auf den ersten zeitlichen Abschnitt nach dem thermischen Trauma. In dieser Phase laufen im Organismus die Reaktionen ab, die durch den Proteinaseinaktivator Trasylol günstig beeinflusst werden können.

1.2. Lokales Geschehen

Die lokalen Folgen der Hitzeeinwirkung manifestieren sich in der Verbrennungswunde. Die Reaktionen der Haut auf den thermischen Schaden sind

1. die direkte Gewebsschädigung und
2. die Entzündungsreaktion.

Wichtig ist die Feststellung, daß die morphologischen und biochemischen Veränderungen, die bei der direkten Gewebsschädigung auftreten, abhängig sind von der Zeitdauer und der Temperatur der Hitzeeinwirkung. An der Hautoberfläche führen bereits Temperaturen von 70° C, bei einer Einwirkungszeit von weniger als einer Sekunde, zur epidermalen Nekrose.

Je nach Dauer und Art der Temperatureinwirkung reicht die Nekrose unterschiedlich tief. Die Haut und ihre Anhangsgebilde sowie die darunterliegenden Gefäße können ihre Funktion nicht mehr wahrnehmen. Strukturprotein wird koaguliert, ganze Zellschichten werden zerstört, im weiteren Bereich gehen wichtige Zellstrukturelemente zugrunde.

Es kommt zur Freisetzung von intrazellulären Bestand-

teilen, die nun den extrazellulären Raum überschwemmen und das homöostatische Gleichgewicht stören. Elektrolyte, vor allem das intracelluläre Kalium und Eiweißbruchstücke erhöhen den osmotischen Druck; saure Stoffwechselprodukte verschieben den pH-Wert.

1.2.1. Permeabilitätsschädigung der Kapillaren

Die Gefäße reagieren mit einer erhöhten Permeabilität der Kapillarmembranen und Venolen sowie einer Konstriktion der Arteriolen, was den wichtigsten Aspekt der Entzündungsreaktion nach einer Verbrennung darstellt; aus dem intravasalen Raum tritt Plasma in den Extrazellulärraum. Die kolloidosmotische Druckdifferenz zwischen dem kapillären Plasma und dem Extrazellulärraum ist durch diese zwei Pathomechanismen praktisch aufgehoben.

Die Erhöhung der Kapillarpermeabilität im verbrannten Gewebe zeigten KING, REYNOLDS und PRICE (100) mit der Verteilung von Evans-blue (T-1824) in diesem Gebiet. Dabei sind das an der Körperoberfläche erscheinende Exsudat und Ödem nur ein Bruchteil des Gesamtverlustes an Körperflüssigkeit; während gleichzeitig in den Geweben ein wichtigerer und größerer Verlust stattfindet, der zunächst unsichtbar bleibt und erst später als typisches Verbrennungsödem erkennbar wird.

Im Gegensatz zu früheren Auffassungen neigt man heute zu der Annahme, daß die veränderte Kapillarpermeabilität nicht nur auf das verbrannte Gebiet beschränkt bleibt, sondern auch fernab von der Verbrennung auftritt und dort ebenso zu Ödemen führt.

Der oft enorme Flüssigkeitsverlust von mehreren Litern hält im allgemeinen für 48 Stunden an, wobei die Hälfte davon bereits in den ersten 6 - 8 Stunden aus dem Kreislauf verloren geht.

Die Flüssigkeit kann sich an der verbrannten Oberfläche oder aber auch subkutan sammeln. An der Oberfläche entstehen Blasen, die man an der Trennung der Epidermis von der Dermis beobachten kann.

Die subkutane Ödembildung findet sich besonders dann, wenn die Hautoberfläche koaguliert ist. Bei schweren Verbrennungen entwickelt sich das subkutane Ödem sehr schnell; und es kommt zu einer Stase in den Kapillaren.

Durch Blutvolumenbestimmungen konnte festgestellt werden, daß Volumenverluste schon unmittelbar nach dem Verbrennungstrauma einsetzen. Bereits ein bis zwei Stunden nach dem Trauma kommt es, in Abhängigkeit des Ausmaßes der Verbrennung, zu einer 15 - 30 %igen Abnahme des zirkulierenden Blutvolumens. Daraus zeigt sich, daß die ersten vier bis sechs Stunden von entscheidender Bedeutung für die Therapie sind. Ödembekämpfung und Verhinderung eines intravasalen Volumendefizits sind ausschlaggebend für Ausmaß und Schwere der Verbrennungskrankheit und für ein Überleben des Patienten.

Das sehr schnell entstehende initiale Ödem beruht auf einem Verlust von intravasaler Flüssigkeit in das extravasale Gewebe. Verantwortlich dafür sind:

1. Erhöhter Filtrationsdruck,
2. erhöhte osmotische Kräfte im Gewebe (Zellzerfall) und
3. starke Permeabilitätserhöhung der Gefäße.

Dabei kommt es mehr zu einem Verlust an osmotisch wirksamem Albumin als des höhermolekularen Globulins: die kolloidosmotische Druckdifferenz wird aufgehoben. Zusätzlich treten korpuskuläre Elemente aus, wie Granulozyten, Lymphocyten, Monocyten und Erythrocyten. Der Sinn dieser Prozesse liegt in der Einleitung reparativer Vorgänge: dem Abtransport und der Hemmung toxischer Stoffwechselprodukte und freiwerdender Enzyme,

der Mobilisierung von zur Phagocytose fähiger Zellen und solcher, die zur Neubildung von Gewebe fähig sind.

Die Ursache und die genaue Lokalisation der Permeabilitätserhöhung für höhermolekulare Stoffe und korpuskuläre Elemente steht im Mittelpunkt vieler sich widersprechender Untersuchungen. Einerseits wird der Nachweis geführt, daß nur die direkte Schädigung des Gefäßendothels für die Permeabilitätserhöhung verantwortlich ist (HURLEY et al. 1967, HAM and HURLEY 1968, RYAN and HURLEY), andererseits werden viele gefäßaktive Stoffe diskutiert, die auf Arteriolen, Kapillaren und Venolen wirken.

Die zahlreichen sich widersprechenden Thesen spiegeln die Komplexität der sich abspielenden Vorgänge wieder. Darüberhinaus sind weder die strukturellen noch die biochemischen Grundlagen zur Lösung dieser Fragen ausreichend geklärt.

Die Tatsache, daß es bei der Verbrühung zu einem ubiquitären Ödem kommt, beweist indirekt, daß den vasoaktiven Pharmaka bei der Permeabilitätserhöhung eine zentrale Rolle im pathophysiologischen Geschehen zukommt. Eine kausale Therapie müßte die Wirkung dieser Substanzen aufheben oder ihre Freisetzung verhindern.

1.2.2. Strukturelle Grundlage - Angriffspunkte vasoaktiver Stoffe

Für den Organismus stellt die Gefäßwand im weitesten Sinne die Austauschfläche zwischen dem Intravasalraum und dem Extrazellulärraum dar. Die Funktion dieser Austauschfläche ist abhängig von der Gefäßwandstruktur, dem Gefäßinhalt und dem Extrazellulärraum. Regulierend auf diese Austauschfläche wirken viele gefäßaktive Stoffe, teilweise indirekt durch Freisetzung über das Nervensystem, teilweise direkt im Sinne einer Autore-

gulation (Sh. Tab. 1).

<i>1. Einfluß auf das vegetative Nervensystem</i>	
<i>Überträgersubstanzen und Rezeptorenwirksame Substanzen</i>	
Parasympathikomimetika	Azetylcholin
Sympathikomimetika	Adrenalin
	Noradrenalin
Parasympathikolytika	Atropin
Sympathikolytika	α-Rezeptorenblocker: Dibenamine, Phenoxybenz- amine, Sekale-Alkaloide, Tolazoline, Phentolamine, Azapetine
	β-Rezeptorenblocker: Proteranol, Promethalol, Propranolol
β-Rezeptorenstimulatoren	Isopropylnoradrenalin, Nylidrine, Isoxsuprine
Antidiuretische Substanzen	Guanethidine, Rauwolfia-Alkaloide, Methyldopa
Zentral wirksame Substanzen	Imidazolin, Rauwolfia-Alkaloide
<i>2. Direkten Einfluß auf das Erfolgsorgan</i>	
Biogene Amine	Histamin
	Nukleotide
Polypeptide	Vasopressin
	Angiotensine
	Kinine
Prostaglandine	Prostaglandin E ₁ -E ₂ -E ₂₂
<i>3. Substanzen mit ungeklärtem Wirkungsmechanismus</i>	
Isocholininderivate	
Nikotinäurederivate	
Dipyridamole	
Hydralazine	

Tab. 1: Steuerung der Austauschfläche
(aus: Generalisierte intravasale Gerinnung,
Schattauer-Verlag, Stuttgart, 1971)

Sie beeinflussen in der Regel die Weite und Durchlässigkeit der Endstrombahn. In extrem hoher Dosierung erhöhen sie sogar die Permeabilität für makromolekulare Substanzen, nicht dagegen für Blutzellen.

Korpuskuläre Elemente treten erst nach einer Schädigung der Basalmembran durch die Gefäßwand in das Interstitium. Nur bei pathologischen Prozessen, wie z.B. bei der Verbrühung oder Pankreatitis, werden Stoffe freigesetzt, die die Basalmembran schädigen. Dazu gehören:

1. Die Amine Histamin und Serotonin,
2. die Polypeptide Bradykinin und Kallidin,
3. die Proteasen Kallikrein, Plasmin, Globulin-Permeabilitäts-Faktor, Trypsin, Phospholipase, Kollagenasen und Hydrolasen sowie
4. verschiedene Mediatoren wie Lysolecithine und Pyrogene.

Bei vereinfachter Betrachtung besteht die Wandung der Kapillaren und Venolen aus zwei Bauelementen:

Einer meist kontinuierlichen Schicht von mechanisch labilen Endothelzellen und dem stabilisierenden Halteapparat, bestehend aus Basalmembran und umgebenden Fibrillen.

Hauptsächlich studierte man die Ablagerung von Partikeln in verschiedenen Gefäßarealen. Sie treten meist aus dem Endothelrohr aus, wahrscheinlich durch interzellulär gelegene Spalten und Poren. Die darunter liegende Basalmembran fängt die Partikel ab und wird so markiert. Gegenüber Plasmaproteinen kommt der vasculären Basalmembran keine Schrankenfunktion zu (BRUNS und PALADE 1968). Tusche wird jedoch zurückgehalten, so daß man die Basalmembran als "Grobfilter" bezeichnen kann.

Der "Feinfilter" dürfte für Plasmaproteine durch die Endothellage repräsentiert sein. Der Ort des Durchtritts von Flüssigkeit und kleinmolekularen Substanzen durch die Zellschicht liegt noch nicht mit wünschenswerter Sicherheit fest. Der Durchtritt kann durch die Wirkung von Mediatoren unter Öffnung von interzellulären Spalten (MAJOV und PALADE 1961) oder durch die direkte Schädigung der Endothelzelle erfolgen, was einen Austritt von Plasma zur Folge hat.

Es sind auch Wege durch das Zytoplasma, z.B. an besonders dünnen Stellen, durch Fensterung oder durch Pinocytose zu diskutieren.

1.2.3. Mediatoren

HABERMANN stellt daher zwei Typen von gefäßaktiven Pharmaka gegenüber:

Typ I - Mediatortyp - greift am labilen und dünnen Endothelschlauch (Tunica interna) an und reguliert die Feinfilterfunktion für Plasmaproteine.

Typ II wirkt durch eine Schädigung der Basalmembran (Tunica media) und des fibrillären Halteapparates (Tunica externa).

1.2.3.1. Typ I: Kinine, Prostaglandine und Histamin

Die Erhöhung der Durchlässigkeit durch Substanzen vom Mediatorotyp beschränkt sich auf den Austritt löslicher Stoffe sowie von Kolloiden (z.B. Tusche) und ist, soweit untersucht, mit Änderungen der Gefäßweite verbunden. Solche Änderungen sind an der Blutdrucksenkung bei systemischer Applikation erkennbar. Entsprechende Faktoren sind Kallidin, Bradykinin (178), Permeabilitätsglobuline, Histamin und Serotonin.

Ferner wird die zunehmende Permeabilität auf eine Beteiligung verschiedener Prostaglandintypen zurückgeführt, die in der menschlichen Haut gefunden wurden. Dabei sollen Prostaglandine vom Typ E1 und E2 außer einem respiratorischen Effekt (143, 162) einen lokalen Permeabilitätseffekt für Histamin, Bradykinin und Serotonin aufweisen (33).

Der vasculäre Permeabilitätseffekt des Prostaglandin E wird durch die Degranulation von Mastzellen vermittelt (92).

Durch die Freisetzung dieser gefäßaktiven Substanzen aus geschädigten Zellen wird zusätzlich auch die Permeabilität der nicht direkt geschädigten Kapillaren im Organismus erhöht.

Der Histaminspiegel erreicht 1 Stunde nach der Verbrühung das 10 - 12fache der Norm (KOSLOWSKI).

Die Mediatoren steigern experimentell mehr die Permeabilität der Venolen als die der Kapillaren (WALDVOGEL, FRIMMER). Nach einer hämodynamischen Theorie kontrahieren sich die kleinsten Venen, zusätzlich di-

latieren Arteriolen unter dem Einfluß der Mediatoren, wodurch der venoläre und kapilläre Druck steigt. Es kommt damit zur Permeabilitätssteigerung, Stase und Hämokonzentration (161, 68, 18).

Die Permeabilitätserhöhung mit dem Auseinanderrücken der Endothelzellen ist ein Überdehnungsschaden, der die Venolen besonders stark betrifft, da sie muskelarm sind und im lockeren Bindegewebe liegen.

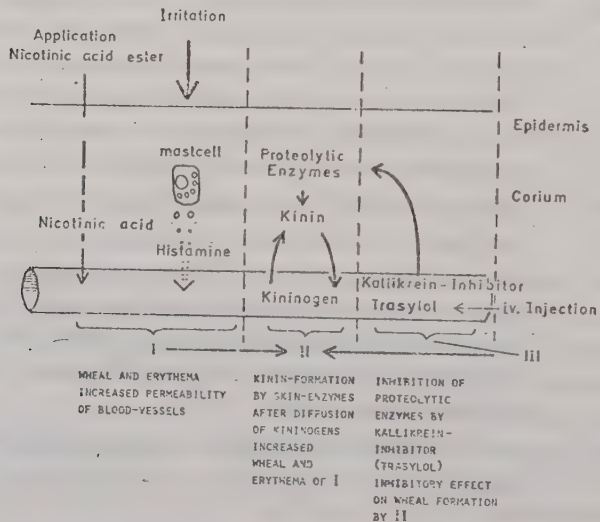


Abb. 1: Die Kininfreisetzung in der menschlichen Haut einschließlich dem Inhibitoreffekt von Trasyol (aus: Stüttgen, Enzymatic Formation of Active Polypeptides in the Human Skin)

1.2.3.2. Typ II. Proteasen und spezifische Faktoren

Die Permeabilitätserhöhung durch Typ II beruht auf der Strukturgiftigkeit z.B. von Tensiden, Proteinasen wie Trypsin und Chymotrypsin, Phospholipase A und im Gefolge davon Lysolecithin, Koagenase, Hydrolase und anderen spezifischen Faktoren.

Eine Schädigung durch Typ II führt daher zum Zusammenbruch der Schranke überhaupt und im extremen Fall zur Hämorrhagie.

1.3. Flüssigkeitsverlust und Hämokonzentration

Die Folge der Membranschädigung ist ein enormer Verlust von proteinreicher Flüssigkeit, da nach COPE und MOORE (32) die Kapillaren in der verbrannten Haut fast so durchlässig für Kolloide werden wie normale Kapillaren für Ionen. Das Ödem nach Verbrennungen oder Verbrühungen ist also obligat und nicht zu verhindern.

Quantitativ entspricht dieses Ödem bei Verbrennungen von 30 % oder mehr der Körperoberfläche rund 10 % des Körpergewichtes.

Der Flüssigkeitsverlust bei ausgedehnter Verbrennung setzt sich also zusammen aus dem Wundexsudat, das 3 - 4 % Protein enthält, dem ebenfalls eiweißhaltigen Ödem und dem Verlust an destilliertem Wasser durch Verdampfung auf der verbrannten Haut. Dieser Flüssigkeitsverlust führt zu einer Hämokonzentration - der Hämatokritwert nimmt nach UNDERHILL (184) zu - und damit zur Stase, die noch unterstützt wird durch reaktive Vasokonstriktion.

Es kommt zu einer gefährdeten Organdurchblutung vor allem von Niere und Darmtrakt, aber auch die Leberschädigung ist ein integrierter Teil des "Burn Syndrom" (175).

1.4. Störung der Mikrozirkulation

Da es durch Verbrennung zu schweren Erythrozytendeformierungen kommt (19), wobei die Zellflexibilität verloren geht und die Passage durch engste Gefäße blockiert wird, ist die Störung der Mikrozirkulation das entscheidende Symptom bei schweren thermischen Läsionen.

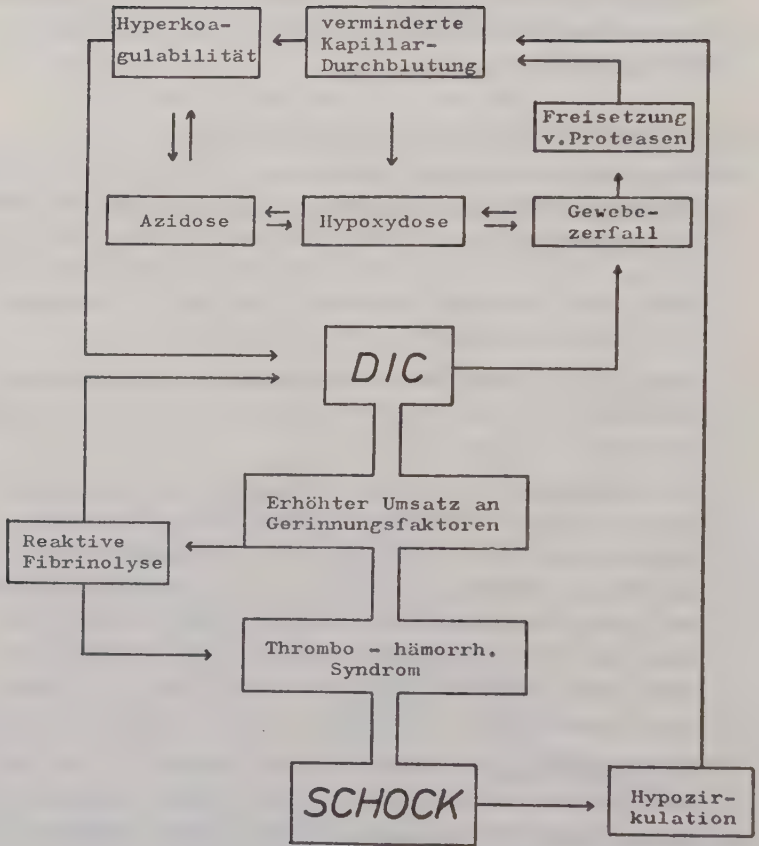


Abb. 2: Reaktive Fibrinolyse (aus: Neue Aspekte der Transylol-Therapie, Band 5, Schattauer-Verlag, Stuttgart, 1972)

1.5. Circulus Vitiosus des Schocks

Es beginnt hier ein Circulus-Vitiosus, der nicht nur für den massiven Überhitzungsschock charakteristisch ist, sondern auch das Kardinalsymptom aller übrigen bekannten Schockformen darstellt; wobei Schock definiert ist als

ein Zustand beeinträchtigter Kreislaufverhältnisse mit ungenügender Gewebsperfusion und einem Mißverhältnis zwischen dem Sauerstoffbedarf der Gewebe und der am Ort vorhandenen Sauerstoffmenge.

Innerhalb der verschiedenen Schockformen nehmen der Verbrühungs- und Verbrennungsschock eine Sonderstellung insofern ein, als bei diesen bereits in der Frühphase eine Übergerinnbarkeit im Vordergrund steht (107).

1.5.1. Hyperkoagulabilität

Aus der Abb. II (154) wird mit der frühzeitigen Hyperkoagulabilität und der verminderten Kapillardurchblutung der Eintritt in den oben erwähnten Circulus Vitiosus deutlich; verminderte Kapillardurchblutung bewirkt Hypoxydose der zu versorgenden Gewebe.

1.5.2. Azidose

Als metabolische Folge einer unzureichenden Sauerstoffversorgung der Gewebe - die Zellen wechseln vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel (84) - entwickelt sich eine Azidose, die in erster Linie durch den vermehrten Anfall von Milchsäure bedingt ist (213, 36, 160).

Die Laktatazidose stimuliert das Nebennierenrindenmark (140), wodurch Arterenol und Adrenalin vermehrt ausgeschüttet werden und Erhöhungen des Adrenalingehaltes im Blut um das 50-fache und des Arterenolgehaltes um das 8-fache erreicht wurden (117).

1.5.3. Strömungsverlangsamung

Diese und andere sich im Gewebe und in Gefäßen stark anhäufenden, vasodilatatorisch wirkenden Metabolite führen zur Hyperosmose im Gewebe und zur maximalen Eröffnung des Kapillarkreislaufes und somit zur Strömungsverlangsamung (89).

Verstärkt wird dieser Prozess dadurch, daß es zu einer Leukodiapedese kommt. Aus den Leukozyten werden Proteinase in Freiheit gesetzt. Der bestehende niedrige pH verstärkt dabei die Proteinasefreisetzung, die den Abbau von größeren Eiweißmolekülen steigert und damit wieder zu einer Erhöhung der Hyperosmose beiträgt. Auf die Freisetzung der Proteinase wird an späterer Stelle noch eingegangen.

Die Strömungsverlangsamung bewirkt eine Separation (Skimming) von Plasma und korpuskulären Blutbestandteilen (27, 146, 172, 214) und durch die längere Verweildauer gerinnungsaktiver Substanzen in der Endstrombahn, weil diese nur unzureichend zu den Clearanceorganen abtransportiert werden, indirekt eine Hyperkoagulabilität. Sie ist charakterisiert durch den Abfall der Thrombozyten und durch eine Aktivierung der Faktoren fünf und acht.

Im Thromboelastogramm sieht man eine Verkürzung der Reaktionszeit, während trotz verminderter Thrombozytenzahl die maximale Amplitude des Thromboelastogramms zunächst breiter wird.

1.5.4. Verbrauchskoagulopathie

Da die Hyperkoagulabilität auch, wie schon vorher beschrieben, direkt durch die Überhitzung des Gewebes induziert wird, kann sie leicht überkritisch werden, und eine ursprünglich funktionelle reversible Störung der Mikrozirkulation kann jetzt in ein unkontrolliertes und unmäßiges Gerinnen des zirkulierenden Fibrinogens übergehen.

Diese Mikrothrombosierung beginnt mit der Freisetzung einer gerinnungsaktiven Substanz, wie Gewebsthromboplastin in die Zirkulation, was zur Bildung von Thrombin führt, welches wiederum das zirkulierende Fibrinogen in Fibringerinnsel überführt.

Ausgehend von der Aktivierung des Hagemanfaktors verläuft die Verbrauchskoagulopathie mit dem Verbrauch folgender Faktoren ab (HEENE):

I (Fibrinogen), II (Prothrombin), V (Proaccelerin), VIII (Antihämophiles Globulin A), XIII (Fibrinstabilisierender Faktor).

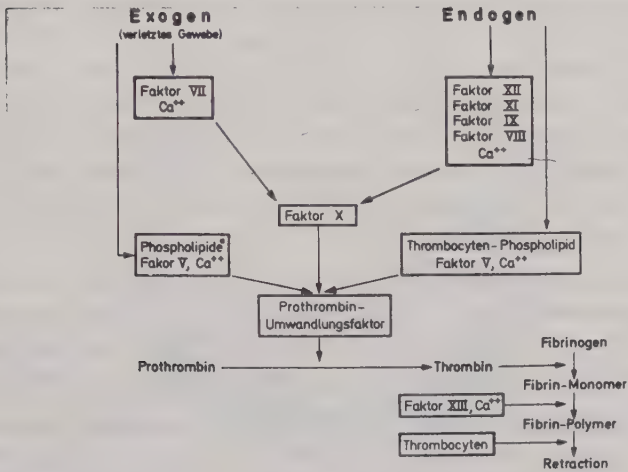


Abb. 3: Schematische Darstellung der Blutgerinnung (aus: Med. Physiologie, Springer-Verlag, Berlin, 1971)

Charakteristisch bei der DIC und von vielen Arbeiten beschrieben (10, 81, 98, 113, 126, 144, 153, 167) ist die Aufeinanderfolge von Hyper- und Hypokoagulabilität mit ausgedehnten intravasalen Gerinnungsvorgängen.

Tritt dabei eine kritische Verminderung des Hämostasepotentials auf, hat dies eine hämorrhagische Diathese zur Folge (111, 113, 141), charakterisiert durch die Thrombozytopenie mit Zahlen von oft weniger als 50.000 pro cmm.

Gleichzeitig neben quantitativen Plättchenverlusten

treten auch grobe qualitative Störungen der noch in der Zirkulation verbleibenden Thrombozyten auf. Sie gleichen den sogenannten Serumthrombozyten.

1.5.5. Hyperfibrinolyse

Pathologisch anatomisches Substrat der intravasculären Gerinnung sind Fibrindepositionen in der Gefäßperipherie, auch "Shock-bodies" genannt und letztlich von SANDRITTER (165) nachgewiesen. Bei dieser intravasalen Gerinnung entwickelt sich nicht nur ein gesteigerter Umsatz an Gerinnungsfaktoren, sondern die hämorrhagische Diathese wird häufig noch durch eine reaktive Hyperfibrinolyse bzw. allgemeine (HÜNNEMEYER) Proteolyse verstärkt.

Das klinische Bild der Blutungsbereitschaft - von SELYE Thrombohämorrhagisches Syndrom genannt - entsteht auf zwei Wegen: Erstens durch einen gesteigerten Faktorenumsatz und zweitens durch eine verstärkte Proteolyse.

Diese Thromben werden in der engen Mikrozirkulation aller Organe abgefangen, so daß im Extremfall das zirkulierende Plasma dem Serum gleicht, wie wenn eine Blutgerinnung in vitro stattgefunden hätte.

Durch die Gegenwart von Thrombin in der Mikrozirkulation werden aus dem Gefäßendothel, dem die Gerinnsel anhaften, Plasmin-Aktivatoren freigesetzt.

Das Plasminogen, welches in dem Gerinnsel enthalten ist oder im Serum dem Gerinnsel anliegt, wird in das proteolytische Enzym Plasmin überführt, welches die Thromben enzymatisch zu löslichen Fibrin-Spaltprodukten abbaut. Eine Anzahl von Abbauprodukten wurde identifiziert und charakterisiert, dabei zeigten einige eine starke gerinnungshemmende Wirkung. Wenn das Verhältnis Abbauprodukte zu Fibrin hoch ist, wird das Letztere hierdurch gehindert sich zu Gerinnseln zu polymerisie-

ren, stattdessen zirkuliert es in der Form von löslichen Komplexen mit Fibrinogen oder den Abbauprodukten (127). Der Dualismus zwischen pathologischer Gerinnung des zirkulierenden Blutes und reaktiver lokaler Hyperfibrinolyse bildet die biochemische Grundlage der Mikrothrombosierung - in der anglo-amerikanischen Literatur "disseminated intravascular coagulation" genannt.

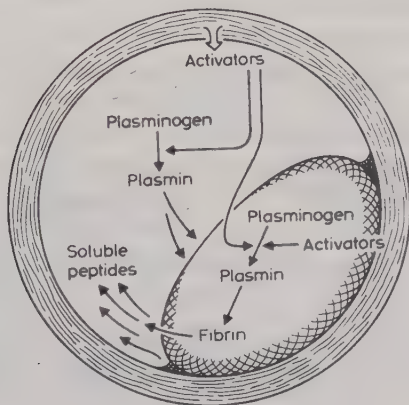


Abb. 4: Aktivierung des fibrinolytischen Systems (aus: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 3, Schattauer-Verlag, Stuttgart, 1969)

Die Ursachen der Umsatzsteigerung sind meist vielschichtig, als wesentlich gelten jedoch:

1. Schockzustände, verbunden mit Störung der Mikrozirkulation sowie lokaler Hypoxie und Acidose (23, 72, 73, 141).
2. Freisetzung von gerinnungsaktiven Substanzen aus Organen (z.B. Lunge oder Prostata) und Einschwemmung in die Blutbahn (81, 141).
3. Blockierung oder unzureichende Durchströmung des retikulo endothelialen Systems (RES) und damit ungenügende Abräumung von gerinnungsaktiven Substanzen aus der Blutbahn (111, 141).

Diese Vorgänge werden u.a. durch die in der Triade aufgezeigten Traumen in Gang gesetzt. Und von allen drei Proteinasen weiß man, daß sie direkt oder indirekt Kinin bilden (39, 70).

Ferner werden sowohl aus den durch die massive Verbrennung lokal zerstörten Zellen sowie aus den durch die vorher erwähnte Azidose zerstörten Zellen und Lysosomen (54, 90) leukozytäre Proteinasen, Plasmin und Kiningenasen freigesetzt (60). Diese Proteinasen haben wiederum eine schädigende Einwirkung oder durch die Freisetzung von vasoaktiven Kininen aus Kiniogen (43). Ferner setzen sie die Gerinnungszeit des Blutes herab. Im Pankreas kommt es zur Freisetzung eines Humoralfaktors, der die Myocardfunktion schädigt ("Myocardial Depressant - Factor" MDF) (116); ferner zur Ausschüttung eines lungenschädigenden Faktors (Pulmonary Lesion - Factor) (44), dessen Ursprung unbekannt ist.

Aktive proteolytische Fermente geraten auch in den Kreislauf und können dort Plasmaeiweißkoloide und Proteohormone abbauen.

Das im Kreislauf vorhandene fibrinolytische Potential kann aktiviert werden, und es kommt zu einem Abbau von Fibrinogen, Albumin und einigen Gerinnungssubstanzen und Gerinnungsfermenten (Faktor V und VII). UNGAR und DAMGAARD konnten ein Einsetzen der Proteolyse bereits in den ersten Minuten nach einer Verbrennung beobachten.

Dies würde auch den von GREUER gefundenen Blutzuckeranstieg nach Verbrühungen erklären, der durch den Abbau des Proteohormons Insulin durch Serumprotryptase verursacht sein könnte (58, 59, 60).

M. ROCHA e SILVA konnte nachweisen, daß beim Verbrühen oder Erhitzen von Hautpartien mit 45° in der Durchströmungsflüssigkeit Histamin, Serotonin und eine kininartige Substanz frei werden.

Die Wirkungen der Kinine beruhen u.a. auf Gefäßerweiterung und Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Wirkungen also, die den Verlauf des Schocks zusätzlich negativ beeinflussen.

ZWEIFACH zeigte nach lokaler Gabe von Kininen eine Erweiterung sowohl der arteriellen wie venösen Seite der Endstrombahn und eine Zunahme der Zahl der durchströmten Kapillaren.

Inzwischen folgten weitere Arbeiten von LEWIS, SPECTOR und WILLOUGHLY sowie ARTURSSON, die das Auftreten von Kininogenasen und Kininen in der das überhitzte Gewebe drainierenden Lymphe herausstellten, wobei LEWIS dies auf eine vorausgehende Freisetzung von Histamin zurückführte.

Bei hoher proteolytischer Fermentaktivität, die bei Verbrennungen entsteht, ergibt sich die Möglichkeit, daß die im Plasma vorhandenen Inhibitoren proteolytischer Fermente: α -Antitrypsin, Inter- α -Antitrypsin, α -Makroglobulin verbraucht bzw. überspielt werden. Es kommt dann zu einer massiven toxischen Schädigung des Organismus, Fibrinolyseblutungen infolge Fibrinogenmangels, proteolytischem Abbau der Plasmaeiweißkoloide und in schweren Fällen zum letalen Ausgang.

Diese für den lebenden Organismus gefährlichen Reaktionsabläufe können mit intravenös zugeführten Inhibitoren zum Teil beeinflußt werden.

2. GESCHICHTE, CHEMIE UND WIRKUNGEN DES KALLIKREIN, DES KININSYSTEMS UND SEINER INHIBITOREN

2.1. Geschichte der Entdeckung des Kallikrein und des Kinin- systems

ABELOUS und BARDIER hatten bereits im Jahre 1909 im Urin eine blutdrucksenkende Substanz entdeckt, die sie Urohypotensin nannten.

1925 erkannte FREY, daß der mittlere Blutdruck von Hunden durch intravenöse Harninjektion im Sinne einer Blutdrucksenkung zu beeinflussen ist (47). Zusammen mit WILLSTAEDTER gelang es ihm, die hochmolekulare, thermolabile Substanz, die zunächst F-Substanz (FREY-Substanz) genannt wurde, zu isolieren. Auf der Suche nach dem Entstehungsort der F-Substanz fand der Arbeitskreis FREY, KRAUT und WERLE große Mengen dieser Substanz in Pankreasextrakten von Rind, Schwein und Mensch. Da das Pankreas als Ursprungsort angenommen wurde, taufte man die F-Substanz in Kallikrein (griechisch: Kallikreos = Pankreas) um.

FREY konnte in Zusammenarbeit mit KRAUT nachweisen, daß diese blutdrucksenkende Substanz durch Kontakt mit Plasma inaktiviert wird. WERLE erkannte, daß das Kallikrein im Pankreassekret größtenteils als inaktive Vorstufe vorliegt, die durch Trypsin aktivierbar ist (190). Weiterhin entdeckte er, daß Kallikrein auch in Speicheldrüsen, Nieren und im Darm gebildet wird (189), was u.a. durch Untersuchungen von ERDÖS (171) und ZEITLIN (212) bestätigt wurde.

In jüngster Zeit wurden von MORIWAKI in den Samendrüsen des Meerschweinchens (136) und von FRITZ in den Akrosomen der menschlichen Spermatozyten (51) Enzyme, die kallikreinhähnlich sind, gefunden.

1936 entdeckte WERLE (191) eine Substanz, die durch Ein-

wirkung von Kallikrein auf Serum entsteht und die eine vielfach höhere Kreislaufaktivität besitzt als das Kallikrein selbst. Er bezeichnete diese Substanz als Kallidin und das Kallikreinsubstrat als Kallidinogen.

1949 fand ROCHA e SILVA eine weitere blutdrucksenkende Substanz, die durch die Proteinase Kallikrein aus dem Blutserum freigesetzt wird: das Nonapeptid Bradykinin (159).

WERLE erkannte 1950, daß Kallidin und Bradykinin aus demselben Substrat im Plasma, einer α_2 -Globulinfraction, stammen; die Isolierung, Sequenzanalyse und Synthese beider Substanzen erfolgte 1960 - 1962 (142, 177). Die durch das Kallikrein freigesetzten Substanzen werden allgemein als Kinine, ihre inaktiven Vorstufen als Kininogene und die Enzyme, die Kinin aus Kininogen freisetzen, als Kininogenasen bezeichnet. Das Verdienst, erkannt zu haben, daß die Proteinase Kallikrein nicht direkt, sondern indirekt durch Freisetzung von Mediatoren = Kinine wirkt, kommt eindeutig WERLE zu.

Bei Säugetieren und beim Menschen kommt die Kininogenase als Präkallikrein (Vorstufe) und als Kallikrein (freie, aktive Form) in Plasma, Pankreas, Parotis, Urin und Mundspeicheldrüsen vor. Im Plasma findet man das Enzym nur als Präkallikrein.

2.2. Chemie des Kallikrein und der Kinine

Kallikrein gehört zur Gruppe der Peptidylpeptid-Hydrolasen. Von der Bausteinanalyse aus gesehen handelt es sich bei den verschiedenen Kallikreinen um Proteinmoleküle mit einem mittleren Molekulargewicht von ca. 34.000; eine Ausnahme bildet das Plasmakallikrein, MG = 97.000 (67). Die Anzahl sowie die Sequenz der Aminosäuren ist sehr ähnlich; außerdem kommen in allen Kallikreinen einige Moleküle Glukosamin und Hexosen, in

vielen, aber nicht in allen Molekülen, Galaktosamin vor.

Als Kinine bezeichnet man die zur Gruppe der Gewebshormone gehörenden biologisch aktiven Polypeptide, die nicht von bestimmten Drüsen sezerniert werden, sondern ubiquitär vorkommen. Zu ihnen gehören die Angiotensin-Gruppe, die Kiningruppe und die Hormone des Gastrointestinaltraktes.

2.3. Wirkungen des Kallikrein und der Kinine

Allen Kallikreinen ist gemeinsam, daß sie Kininogen spalten. Sie zeichnen sich durch hohe Substratspezifität aus und unterscheiden sich durch den Ort, an dem sie ihr Substratmolekül angreifen. So spalten Organ- und Harnkallikrein zwischen Methionin und Lysin, während Plasmakallikrein und Trypsin zwischen Lysin und Arginin spalten (197).

Kallikrein, das über verschiedene Vorstufen entsteht, wirkt als Proteinase und setzt durch Spaltung zweier Peptidbindungen des Kininogens die vasoaktiven Kinine frei: das Nonapeptid Bradykinin und das Dekapeptid Kallidin (sh. Abb. 6), wobei das Bradykinin nur durch Serumkallikrein und Trypsin, nicht aber durch Organkallikreine, freigesetzt wird.

Die Kallikreine aus Harn, Speicheldrüsen und Pankreas sind Isoenzyme, da das Dekapeptid Kallidin ihr gemeinsames Reaktionsprodukt darstellt (179).

Ferner zeigen alle Kallikreine eine esterolytische Wirkung, die vorwiegend gegen Ester des Arginins gerichtet ist (66).

Die Ursachen der Kallikreinaktivierung und Kallikreinfreisetzung können Traumen, Entzündungen, Toxinwirkungen und Schockarten verschiedenster Genese sein.

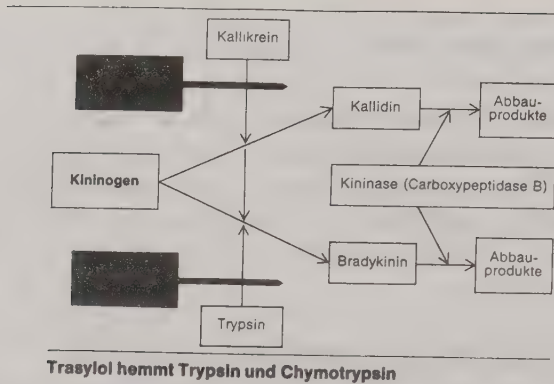


Abb. 6: Wirkung der Proteinasen Kallikrein und Trypsin auf das Kininsystem. (Aus einer Informationsschrift der Fa. Bayer, Leverkusen)

Alle diese Ereignisse führen im Blutplasma zur Umwandlung des inaktivierten in den aktivierten HAGEMANN-Faktor. Dieser wirkt sowohl auf die Blutgerinnung als auch auf die Fibrinolyse, so daß es zu einer Koppelung zwischen diesen beiden Systemen kommt. Außerdem bewirkt der aktivierte HAGEMANN-Faktor die Umwandlung von Präkallikrein in Kallikrein, das seinerseits zur Umwandlung von Kininogen in Kinin führt. Sh. Abb. 7.

Zu einer verstärkten und protrahierten pharmakologischen Wirkung der Kinine kann es durch Hemmung der Kininasen kommen, z.B. durch Carboxypeptidase B,N und durch die im Serum vorkommenden Aminopeptidasen (194).

Die Bildung der Kinine kann über eine Hemmung des Kallikreins durch verschiedene Inhibitoren abgeschwächt oder verhindert werden.

Kinine haben folgende pharmakologische Wirkungen:

- Periphere Vasodilatation und damit verbundene Blutdrucksenkung (139),

- Kontraktion glatter Muskeln von Uterus, Magen, Darm und Bronchien (174),
- Steigerung der Kapillarpermeabilität (158),
- Zunahme der Frequenz sowie des Schlag- und Minutenvolumens des Herzens.

Kinine können Leukozytenwanderungen auslösen (198) und wirken außerdem schmerzauslösend.

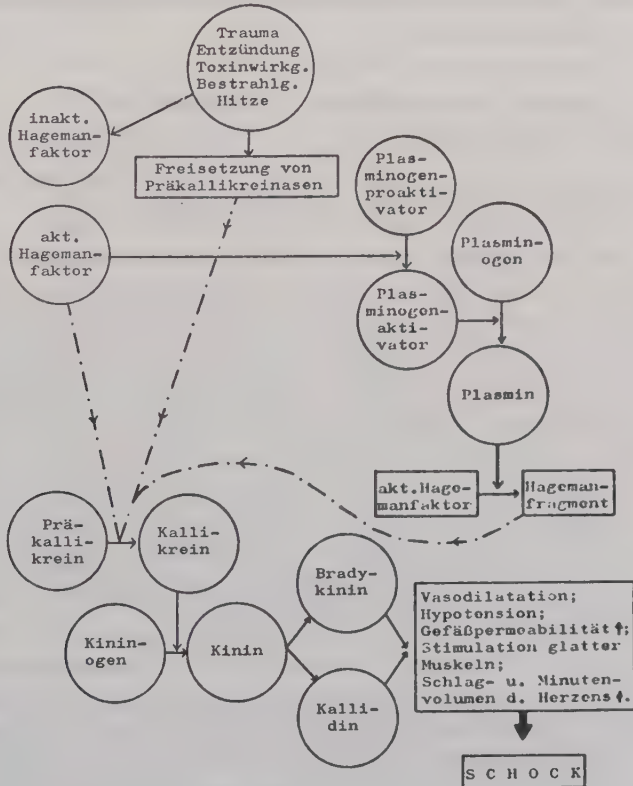


Abb. 7: Entstehungsmechanismus und Wirkungen der Kinine
(-.-.-.-: gilt als nicht gesichert)

LEWIS (121) fand, daß Kinine alle Zeichen der Entzündung - rubor, dolor, tumor, calor, functio laesa - hervorrufen können.

Das Kininsystem steht in vielfältigen Wechselbeziehungen zu anderen Mediatorsystemen. In diesem Zusammenhang konnte LEWIS z.B. nachweisen, daß Bradykinin aus dem Nebennierenmark Catecholamine freisetzt. Es ist denkbar, daß diese Catecholamine zur Gegenregulierung der Kininwirkung dienen.

2.4. Geschichte und Entdeckung des Trasylol

Die Geschichte des Trasylol reicht wesentlich weiter als auf das Jahr 1953 zurück, in dem FREY und Mitarbeiter den Inhibitor in die Klinik einführten.

1929 entdeckte WERLE im Laboratorium von KRAUT einen Inaktivator für Kallikrein im Lymphknoten und Ohrspeicheldrüsen von Rindern. Bei seinen Untersuchungen über den Bildungsort des Kallikrein im Säugetierorganismus stieß er auf eine kleine Drüse (die sich später als Lymphknoten entpuppte), die mit dem Pankreas verbunden war, sich aber in Form und Konsistenz von ihm unterschied. Er nahm an, daß Kallikrein zuerst diesen Lymphknoten passieren müsse, um danach in inaktivierter Form ins Blut zu gelangen (201). Daraufhin extrahierte er solche Lymphknoten und konnte in den klaren Extrakten große Mengen Inaktivator nachweisen.

Später stellte WERLE fest, daß der Inaktivator auch in anderen Organen des Rindes, wie in Leber und Lunge sowie in geringen Mengen auch in Geweben von Ziege und Schaf vorkommt, aber nicht identisch mit dem Serum-Inaktivator ist (187). Der sogenannte Drüseninaktivator - er erhielt später die Bezeichnung Trasylol - ist im Gegensatz zum Serum-Inaktivator niedermolekular und erwies sich als identisch mit dem von KUNITZ 1935 im Pankreas von Rindern nachgewiesenen basischen Trypsin-In-

hibitor, was im Jahre 1965 und 1966 durch die Aufklärung der Aminosäuresequenz durch ANDERER und HÖRNLE (1) sowie LASKOWSKI sen. (96) bestätigt wurde.

Während das Kallikrein bereits sehr früh (1930) durch FREY in Zusammenarbeit mit der Firma Bayer in den Arzneischatz eingeführt wurde, ging die Entwicklung der Inhibitortherapie wesentlich langsamer vor sich. Dies ist verständlich, wenn man die beiden Gründe dafür bedenkt:

1. Stellte die Isolierung und Reinigung des Inhibitors - zuerst aus Rinderparotis, später aus Rinderlungen - eine schwierige Aufgabe für die Biochemie dar und
2. war im Anfang über die pathogenetische Bedeutung von Proteinasen und ihre Inhibitoren bei Krankheiten praktisch nichts bekannt.

Diese Kenntnislücke schloß sich nur langsam, indem über den experimentellen und klinischen Nachweis therapeutischer Wirkungen von Proteinaseinhibitoren der indirekte Schluß der pathophysiologischen Relevanz von Proteinasen gezogen werden konnte. Die wechselseitige Befruchtung und der Umfang der zugewachsenen Erkenntnisbereicherung läßt sich heute noch nicht abschließend beurteilen, da der Prozeß noch keineswegs abgeschlossen ist. Daß seine Bedeutung groß ist, steht jetzt bereits außer Zweifel, ebenso wie die Tatsache, daß wir heute schon mehrere klare Inhibitorindikationen in der Therapie verzeichnen können.

Am Anfang dieser Entwicklung stand der mutige Versuch von FREY, KRAUT und WERLE Trasylol bei der akuten Pankreatitis einzusetzen. In therapeutischer Hinsicht war dies der Ausgangspunkt für den Einsatz von Enzyminhibitoren in der Klinik.

Die Ableitung dieser Indikation geht von der Vorstel-

lung aus, daß dieses Organ besonders reich an Proteinasen ist (Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein, u.a.) und angenommen werden konnte, daß die Aktivitäten dieser Enzyme, die in die Prozesse der Pankreatitis und der Pankreasnekrose eingreifen, durch die intravenöse Verabreichung von Drüseninaktivator gehemmt werden.

Erst zwanzig Jahre später konnte TRAPNELL in einer prospektiven Doppelblindstudie die positive Wirkung von Trasylol bei der akuten Pankreatitis und der akuten Pankreasnekrose nachweisen.

2.5. Chemie des Trasylol

Trasylol ist ein basisches Polypeptid, bestehend aus 58 Aminosäuren und 4 Amidgruppen, mit einem Molekulargewicht von 6513 (sh. Abb. 8).

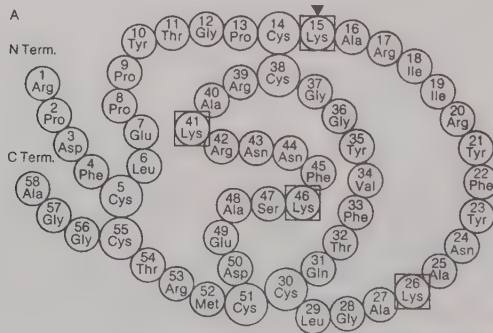


Abb. 8: Struktur des Trasylol
(Aus einer Informationsschrift der Fa. Bayer, Leverkusen)

ACHER sowie LASKOWSKI sen. (28) und jun. konnten nachweisen, daß die freie Aminogruppe des Lysin-15-Restes für die Inhibitorwirkung gegenüber Trypsin von entscheidender Bedeutung ist. FRITZ ermittelte, daß das auch für

die Inhibition von Kallikrein und Chymotrypsin zutrifft (49).

Die Raumstruktur des Trasylol-Moleküls wurde 1970 durch HUBER ermittelt (sh. Abb. 9).

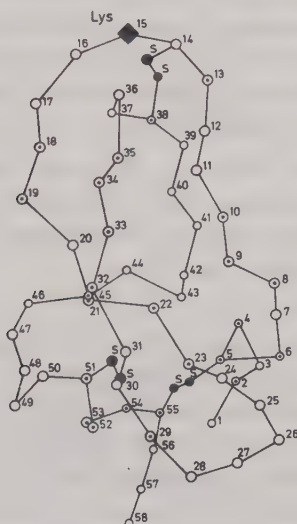


Abb. 9: Dreidimensionale Struktur des Trasylol mit seinem reaktiven Zentrum (aus: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 5, Schattauer-Verlag, 1972)

Danach ist das Molekül birnenförmig, und der Lysin-15-Rest befindet sich in einer etwas hervorragenden Stellung an der Spitze des Moleküls. Die exponierte Lage des reaktiven Zentrums und das hohe Dipolmoment sind wichtig für die schnelle und genaue Orientierung des Inhibitors zum aktiven Zentrum der hemmbaren Enzyme. KASSEL konnte zeigen, daß Trasylol durch Thermo-Lysin bei 60 - 80° C in verschiedene Peptide zerlegt wird.

2.6. Wirkungen des Trasylol

Die durch Trasylol hemmbaren Proteinasen haben eine proteolytische und esterolytische Wirkung. Zur Gruppe dieser Esteroproteinasen gehören außer den Kininogenasen (Kallikrein) das Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Plasminaktivator, die Plasmafaktoren in der Gerinnungsphase und die Gewebs- und leukozytären Proteinasen. Über die Eingriffsmöglichkeiten des Trasylol in pathophysiologische Vorgänge läßt sich folgendes sagen:

Alle Effekte, die durch das Trasylol zustande kommen, müssen auf die Hemmung, die diese Substanz auf die überschießende Freisetzung von Proteinasen im Schockgeschehen ausübt, zurückgeführt werden.

Trasylol wirkt wie folgt:

1. Antithromboplastisch (Verminderung der Hyperkoagulabilität) (17, 21, 138, 157),
2. antifibrinolytisch (89, 129),
3. permeabilitätssenkend und insbesondere hemmend auf die Kininfreisetzung (26),
4. antiödematös (vor allem bei Lungenödem) (20, 112, 122, 134),
5. zirkulationsfördernd (vor allem im Kapillarbereich), erweiternd auf das arterielle und verengend auf das venöse Gefäßbett und damit blutdrucksteigernd bzw. -stabilisierend (99, 123, 149),
6. erhöhend auf den Sauerstoffpartialdruck, verbessernd auf die Sauerstoffsättigung sowie vermindern auf die Wasserstoffionenkonzentration (151, 155),
7. senkend auf hohe Lipidwerte bis zum Normbereich (15, 79).

Außer Trasylol gibt es noch weitere Inhibitoren des Kininsystems. Die wichtigsten dieser Hemmstoffe sind: Der Serum-Inhibitor (204), der Sojabohnen-Inhibitor (108), das Leupeptin (183), das aus Aktinomyzetenkulturfiltraten isoliert wurde und der Seeanemonen-Inhibitor.

Erwähnt werden soll auch ein weiterer neuer Inhibitor aus Weinbergschneckenextrakten - Helicin -, der in einer parallel laufenden Arbeit (110) untersucht wurde. Abb. 10 zeigt, wo der Sojabohnen-, der Serum-, der Kallikrein-Trypsin-Inhibitor und die Carboxypeptidase in das Kallikrein-Kinin-System eingreifen. Die Angriffspunkte des Helicin, des Leupeptin und des Seeanemonen-inhibitors sind in diesem Schema noch nicht enthalten, da ihr Wirkungsmechanismus noch diskutiert wird.

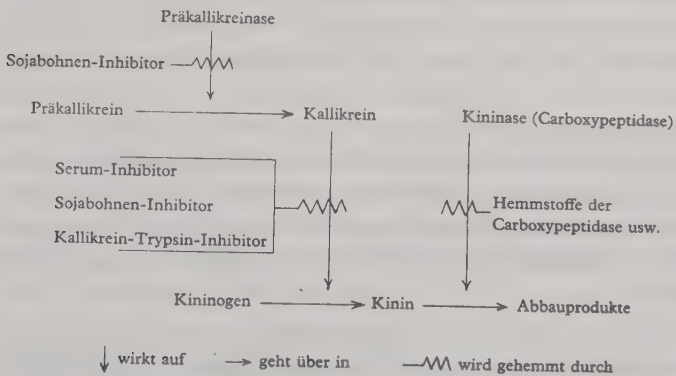


Abb. 10: Wirkungen verschiedener Proteinaseinhibitoren (aus: Das Kallikrein-Kininsystem, Enke-Verlag, Stuttgart, 1968)

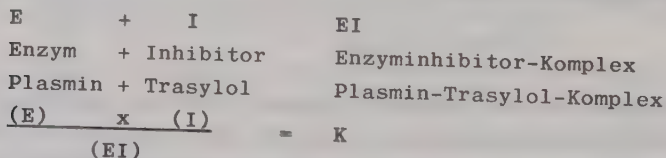
Daß von all den erwähnten Inhibitoren nur das Trasylol im Arzneimittelschatz zu finden ist, liegt in der Verträglichkeit begründet. Aufgrund seines niedrigen Molekulargewichtes (MG 6512) ist die Verträglichkeit bei allen Spezies sehr gut. Die anderen genannten Inhibitoren besitzen ein wesentlich größeres Molekulargewicht und eine wohl in erster Linie hierauf basierende Toxizität, bedingt durch die Antigenwirkung höherer Eiweißmoleküle, die eine klinische Anwendung unmöglich macht. Der neue

Inhibitor aus Seeanemone, der in den vorliegenden Versuchsergebnissen in seiner tierexperimentellen Anwendung dargestellt wird, ist ähnlich dem Trasylol polyvalent und von niedrigem Molekulargewicht. Er stellt so erstmals eine neue echte Alternative und Bereicherung im Arzneischatz dar, falls es gelingen sollte, ihn auch beim Menschen einzusetzen.

Zur antifibrinolytischen Wirkung des Trasylol ist anzumerken:

Die Hemmung der Fibrinolyse kommt durch die Plasmininhibition zustande. Eine Plasmininhibition steht der Auflösung von Mikrothromben (DIC) in der Endstrombahn entgegen. Es ist aber eine unbedingte therapeutische Notwendigkeit, die Mikrozirkulation von Fibrinablagerungen (= Mikrothromben) zu befreien, um so ein Offenhalten der Endstrombahn beim Schock zu gewährleisten. Folglich wäre die Hemmung des Plasmin und damit der Fibrinolyse durch das Trasylol (einer der stärksten Plasmininhibitoren) im Schock scheinbar völlig kontraindiziert.

Diesen Widerspruch scheint HABERLAND (65) aufgeklärt zu haben. Er geht davon aus, daß Enzym (= Plasmin) und Inhibitor (= Trasylol) einen reversiblen Komplex bilden. Die Reaktion erfolgt nach dem Massenwirkungsgesetz.



Dabei handelt es sich um einen Vorgang, der die Verschwendung des Enzyms mit nicht spezifischen Substraten verhindert, nachdem es durch ein Trauma im Überschuß in Freiheit gesetzt wurde. Normalerweise wird im Plasma diese Funktion von zirkulierenden Inhibitoren (z.B. Anti-Trypsin) erfüllt.

Der Inhibitor wird rasch eliminiert, und man erhält ein Puffersystem, das sicherstellt, daß die Aktivierung des Enzyms in dem Bereich bleibt, der für eine therapeutische Fibrinolyse notwendig ist.

Es handelt sich bei dem sogenannten antifibrinolytischen Effekt des Trasylol nicht um eine reine Hemmung der Fibrinolyse, die kontraindiziert wäre, sondern um ein sinnvolles Bremsen der beim Schock überschießenden Plasminaktivierung. So wird einerseits verhindert, daß unphysiologisch viel Substrat (= Fibrin und Fibrinogen) abgebaut wird und andererseits, daß das Enzym (= Plasmin) durch diese unspezifischen Reaktionen vergeudet wird.

Zusammenfassend läßt sich diesbezüglich sagen, daß Trasylol weder ein reines Fibrinolytikum noch ein echtes Antifibrinolytikum ist. Zusammen mit dem Plasmin bildet es über die oben beschriebene pufferähnliche Wirkung einen sinnvollen Bestandteil der beim Schock notwendigen fibrinolytischen Therapie.

2.7. Entdeckung der Proteinasen-Inhibitoren aus der Seeanemone Anemonia sulcata

Während seiner Arbeiten an Toxinen (12, 13, 14, 207, 208) aus *Anemonia sulcata* fand L. BÉRESS (Kiel) eine antitryptische Aktivität (12), die in Zusammenarbeit mit FRITZ (50) einer Vielzahl basischer Polypeptide zugeschrieben werden konnte.

Diese Polypeptide hemmen Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikreine, weswegen eine Ähnlichkeit mit BPTI, dem KUNITZ Inhibitor aus Rinderorganen vermutet worden war (50). WUNDERER (206, 208, 209, 210) gelang aus diesen Polypeptiden die Isolierung von 10 Isoinhibitoren, die sich untereinander nur durch geringfügige Aminosäureaustausche unterscheiden, und die Sequenzanalyse der

Hauptkomponente, die erstaunlich große strukturelle Homologien zu anderen bekannten Breitspezifitätsproteinase-Inhibitoren aus Rinderlungen, Schnecken, Rinderkolostrum, Schildkröteneiern und Schlangengiften aufweist (208, 209, 210).

2.8. Isolierung der Proteinase-Inhibitoren aus der Seeanemone *Anemonia sulcata*

2.8.1. Anreicherung

Aus alkoholischen *Anemonia sulcata* Extrakten wurden die basischen Inhibitoren durch Adsorption an CM-Cellulose angereichert. Nach Elution und Gelfiltration an Sephadex G - 50 lag ein weitgehend angereichertes Isoinhibitorgemisch vor, das eine spezifische Hemmaktivität von 3 IU/mg besitzt und daher nur noch etwa 20 % Verunreinigungen aufweist. Die maximale Aktivität beträgt 3,53 IU/mg (208). Dieses vorgereinigte Isoinhibitorgemisch wurde uns von WUNDERER zur Verfügung gestellt. Es diente als Ausgangsmaterial für die weitere Reinigung.

2.8.2. Affinitätschromatographie an Trypsin-Cellulose

Affinitätschromatographie basiert auf der spezifischen Bindung einer bestimmten Substanz - in diesem Fall der Proteinase-Inhibitoren - an einen Effektor (Trypsin), der kovalent an eine Matrix (Cellulose) gebunden ist (50, 205). Verunreinigungen können leicht mit gepufferten Salzlösungen ausgewaschen werden. Die Dissoziation der Inhibitoren von der Trypsin-Cellulose gelingt mit kompetitiven Inhibitoren oder durch Umstellung des pH auf pH 1,7 (50, 207). Dieses elegante Verfahren wurde zum ersten Mal von FRITZ verwendet (52).

Das oben beschriebene Ausgangsmaterial wurde in 0,1 M Triäthanolamin-Puffer bei pH 7,8 gelöst und im Becherglas mit 5 g Trypsin-Cellulose versetzt. Dabei werden

die Proteinase-Inhibitoren an Trypsin-Cellulose gebunden. Verunreinigungen wurden durch 5 Waschungen der beladenen Cellulose mit 0,4 M NaCl 0,1 M TRA bei pH 8 entfernt. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit Aqua dest. wurde der pH auf 1,7 eingestellt; wobei der Trypsin-Inhibitor-Komplex dissoziiert und die gereinigten Isoinhibitoren erhalten wurden. Nach Entsalzen wurden die Inhibitorlösungen lyophilisiert. Mit diesem so gewonnenen Material wurden unsere Versuche durchgeführt.

2.9. Chemie und physiologische Wirkung der Proteinase-Inhibitoren aus der Seeanemone

Inhibitoren aus *Anemonia sulcata* sind ähnlich stabil wie andere niedermolekulare Proteinase-Inhibitoren. Inhibitoren aus *Anemonia sulcata* können bei Raumtemperatur im pH-Bereich von 1,5 bis 10 über mehrere Stunden ohne Aktivitätsverlust inkubiert werden.

Das lyophilisierte Material behält seine Aktivität über Jahre, wenn es bei Minus 20° C gelagert wird. Die Isoinhibitoren haben ein Molekulargewicht von etwa 6800. Die Hauptkomponente des Isoinhibitorgemisches, der Inhibitor 5 II, besteht aus einem einkettigen Polypeptid mit 60 Aminosäureresten (208). In seinen Teilsequenzen weist dieser Inhibitor eine hohe strukturelle Homologie mit dem KUNITZ-Inhibitor (BPTI) aus Rinderorganen auf. Ebenfalls gehört er wie der KUNITZ-Inhibitor zu den permanenten Inhibitoren. Der Inhibitor 5 II wird in seiner nativen Form weder durch TPCK behandeltes Trypsin (Merck) noch durch TLCK behandeltes Chymotrypsin (Worthington) abgebaut.

Für die KUNITZ-Inhibitoren ist ihre breite Hemmspezifität charakteristisch. Sie hemmen Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin stark, unterscheiden sich aber in ihrer Fähigkeit Kallikreine zu hemmen. Trypsin wird von Inhibitor 5 II stöchiometrisch (1 : 1) gehemmt. Die

Dissoziationskonstante beträgt 3×10^{-10} M (208, 209). Chymotrypsin und Plasmin werden ebenfalls stark gehemmt, dagegen nimmt die Kallikreinhemmung mit der Basizität der Inhibitoren zu, was sehr wahrscheinlich auf einen strukturellen Austausch von Arginin in der Position 39 der Sequenz zurückzuführen ist (206, 208).

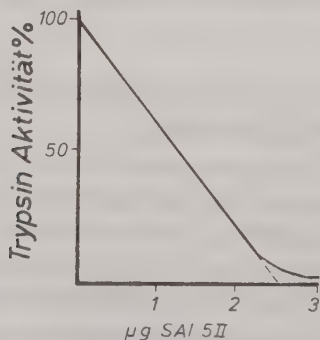


Abb. 11: Hemmung von Trypsin durch Isoinhibitor 5 II aus *Anemonia sulcata* (aus: WUNDERER, Med. Dissertation, München, 1975)

Über die physiologische Funktion der Inhibitoren im Organismus der Seeanemonen besteht noch große Unklarheit.

Folgende Hypothesen werden zur Zeit diskutiert:

- Hemmung von Proteinasen des jeweiligen Beutetieres, damit die von den Nesselkapseln (Nematocysten) der Seeanemone injizierten Neurotoxine ihre Aktivität bewahren. Als Hinweis in dieser Richtung wird die Seeanemone *Metridium senile* angeführt, die keine Neurotoxine besitzt (208) und auch nicht über Niedermolekulare Proteinasen-Inhibitoren verfügt.
- Schutz vor Mikroorganismen (Zoochlorellen), die im Endodarm der *Anemonia sulcata* symbiotisch leben (208).
- Regulierung der Aktivität von körpereigenem Chymo-

Abb. 12: Homologe Strukturen von Polypeptiden:

proteinase Inhibitoren aus Seeanemonen (SAI), aus Rinderorganen (BPTI), aus Helix pomatia (HPI), aus Schildkröteneiern (TTI) und aus Russell's viper (RVI).

SAI	Ile Asn Gly Asp Cys Glu Leu Pro Lys Val Val Gly Pro Cys Arg Ala Arg	
BPTI	Arg pro Asp Phe Cys Leu Glu pro pro Tyr Thr Gly pro Cys Lys Ala Arg	
HPIK	pyr Gly Arg pro Ser Phe Cys Asn Leu pro Ala Glu Thr Gly pro Cys Lys Ala Ser	
TTI	X(Lys, Gln, Asn, Gly, Arg) Asp Ile Cys Arg Leu pro pro Glu Gln Gly pro Cys Lys Gly Arg	
RVI	His Asp Arg pro Thr Phe Cys Asn Leu Ala pro Glu Ser Gly Arg Cys Arg Gly His	
SAI	Phe Pro Arg Tyr Tyr Asn Ser Ser Lys Arg Cys Glx Lys Phe Ile Tyr Gly Gly	
BPTI	Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr Phe Val Tyr Gly Gly	
HPIK	Phe Arg Gln Tyr Tyr Asn Ser Lys Ser Gly Gly Cys Gln Gln Phe Ile Tyr Gly Gly	
TTI	Ile pro Arg Tyr Phe Tyr Asn pro Ala Ser Arg Met Cys Glu Ser Phe Ile Tyr Gly Gly	
RVI	Leu Arg Arg Ile Tyr Tyr Asn Leu Glu Ser Asn Lys Cys Lys Val Phe Phe Tyr Gly Gly	
SAI	Cys Arg Gly Asx Ala Asx Asx Phe His Thr Leu Glx Glx Cys Glx Lys Val Cys Gly Val	
BPTI	Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly	
HPIK	Cys Arg Gly Asn Gln Asn Arg Phe Asp Thr Thr Thr Gln Cys Gln Gly Val Cys Val	
TTI	Cys Lys Gly Asn Lys Asn Asn Phe Lys Thr Lys Ala Glu Cys Val Arg Thr Cys Gly Pro	
RVI	Cys Gly Gly Asn Ala Asn Asn Phe Glu Thr Arg Asp Glu Cys Arg Glu Thr Cys Gly Gly	
SAI	Arg Ser	
BPTI	Ala	
HPIK	-	
TTI	Gly Ile Cys Leu 60 weitere Reste	
RVI	Lys	

trypsin. Hierfür spricht, daß auch beim Rind neben Chymotrypsin ein spezifischer Trypsininhibitor gefunden wurde.

Erwähnenswert ist noch, daß die größte Inhibitorkonzentration in den Tentakeln gefunden wurde (106).

2.10. Verteilung und Ausscheidung von Trasylol im Vergleich zum Seeanemoneninhibitor nach intravenöser Injektion bei der Ratte

2.10.1. Methode der Untersuchung

Die Verteilung des in der Klinik zu therapeutischen Zwecken schon vielfach eingesetzten polyvalenten Trypsin-Kallikrein-Inhibitors Trasylol nach intravenöser Injektion im Organismus wurde bereits in mehreren Arbeitskreisen untersucht (5, 11, 16, 46, 80, 93, 180, 181, 196, 199, 200). Dabei wurde festgestellt, daß der Inhibitor einige Zeit nach der Injektion selektiv in den Nieren fixiert wird.

Die Inhibitorlösungen (0,5 - 1,0 ml, Lösungsmittel: phys. Kochsalzlösung) wurden den Ratten in die Schwanzvene injiziert. Zu bestimmten Zeitpunkten post injectionem wurden die Tiere durch Dekapitation entblutet, die Organe extirpiert und sofort aufgearbeitet oder bei Minus 20 Grad eingefroren. Bis zum Zeitpunkt der Tötung wurde der ausgeschiedene Urin gesammelt (Stoffwechselkäfig, Blasenkatheter).

Der in den Organen von unbehandelten Ratten gefundene Gehalt an säurestabilen Trypsinhemmstoffen wurde auf mittlere Konzentration pro Gramm Gewebe bzw. ml Serum ermittelt (Tabelle II).

Diese Werte konnten dann mit den Organgewichten der zu den Versuchen verwendeten Ratten multipliziert werden. Dieser Leerwert wurde dann von dem gefundenen In-

hibitorgehalt der mit Inhibitor behandelten Tiere subtrahiert.

Organ	Serum	Nieren	Leber
mIU/Organ	153-199	44-76	69-117
Mittelwerte	173	57	93
mIU/ml bzw. mg	14	10	2

Tab. II: Gehalt und Konzentration an säurestabilen Trypsinhemmstoffen bei unbehandelten Ratten. (aus: Zeitschrift Physiol. Chemie, Bd. 350, 1969)

2.10.2. Verteilung von Trasylol

Nach intravenöser Injektion des Inhibitors in Ratten (Abb. 13 u. 14) stellte FRITZ (48) fest, daß die Konzentration im strömenden Blut relativ rasch absinkt, um zeitlich etwas verzögert in den Nieren stark anzusteigen, so daß 1 Std. nach der Injektion bereits 60 % und nach 4 Std. 80 % der injizierten Inhibitor-menge in den Nieren gefunden wurden.

Dort wird der Inhibitor im Laufe von Tagen langsam inaktiviert; nur bis zu 2 % der injizierten Inhibitor-menge werden in aktiver Form mit dem Harn ausgeschieden.

3 - 6 % der injizierten Aktivität sind in der Leber über einen längeren Zeitraum hinweg nachzuweisen. In allen anderen Organen tritt eine nennenswerte Inhibitoraktivität nicht auf.

Der Serum-Inhibitorspiegel zeigt, daß sich 30 - 40 Minuten nach der Injektion das Verteilungsgleichgewicht eingestellt hat und der Inhibitor dann mit einer Eliminationshalbwertszeit (Definition nach DOST)

(35) von ca. 70 Minuten aus der Blutbahn ausgeschieden wird.

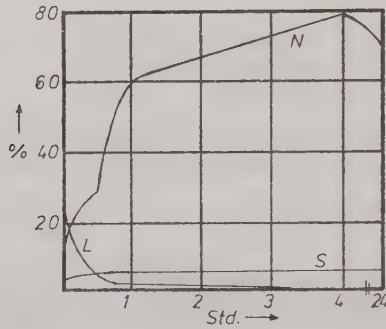


Abb. 13: Konzentration von Trasylol nach i.p. Injektion in: N = Niere L = Leber S = Serum (aus: Zeitschrift Physiol. Chemie, Bd. 350, 1969)

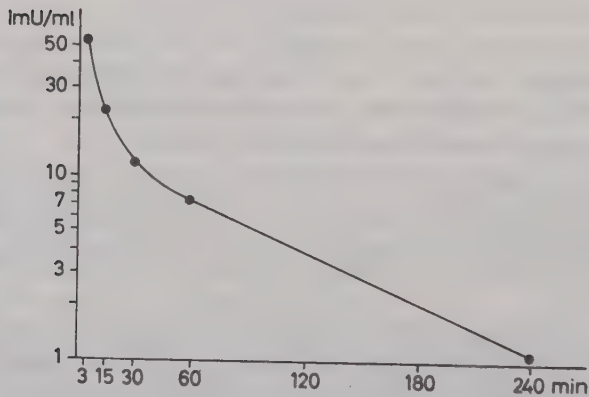


Abb. 14: Trasylol-Blutspiegelkurve nach Injektion von 18000 KIE/kg Körpergewicht bei Ratten. (aus: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 3, Schattauer-Verlag, Stuttgart)

In Abb. 15 ist die im Organismus der Ratte zu den angegebenen Zeitpunkten insgesamt wieder auffindbare Inhibitormenge angegeben.

Die hohen Ausbeuten sind dabei hauptsächlich auf die Fixierung des Inhibitors in den Nieren zurückzuführen.

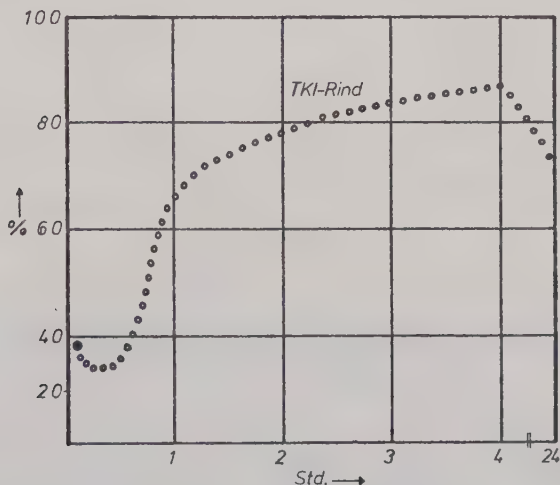


Abb. 15: Prozentsatz der in Organen von Ratten insg. wieder auffindbaren Inhibitoraktivität (aus: Z. Physiol. Chemie, Bd. 350, 1969)

Auch beim Menschen sinkt die Inhibitorkapazität im Blut rasch ab, so daß 10 Minuten post injektionem nur noch ca. 8 % des Trasylols im Blut nachweisbar sind. Mit dem Harn werden nur 1,5 % der injizierten Aktivität ausgeschieden.

2.10.3. Verteilung des Seeanemoneninhibitors

Die Abbildung der Dissertationsarbeit von SCHORP, (168), Abb. 16 zeigt, daß nach intravenöser Injektion

des Seeanemoneninhibitors in Ratten die Konzentration im Serum ebenfalls schnell absinkt, um nach 5 Std. p. inject. 0 % zu erreichen.

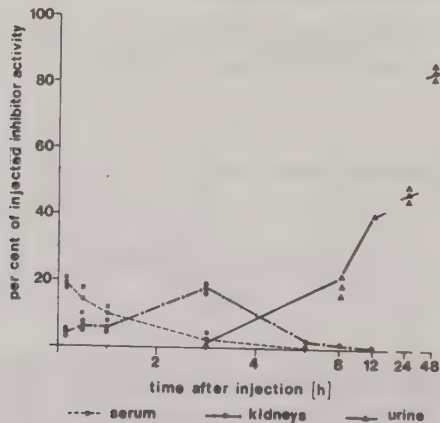


Abb. 16: Verteilung des Seeanemoneninhibitors in Serum, Nieren und Urin bei Ratten (aus: SCHORP, Dissertationsarbeit in Vorbereitung)

Zeitlich verzögert steigt die Konzentration in den Nieren und erreicht dabei bereits nach 3 Std. p. inject. ihr Maximum mit ca. 20 % der injezierten Menge. Nach 5 Std. ist die Konzentration in den Nieren bereits auf 5 % abgefallen und nach 12 Std. ist kein messbarer Inhibitorspiegel in den Nieren mehr nachweisbar.

Sobald in der Niere nach 3 Std. das Konzentrationsmaximum feststellbar ist, wird auch im Harn eine messbare und während des weiteren Versuchsablaufs stetig steigende Inhibitorkonzentration festgestellt, die nach 48 Std. 85 % beträgt.

Aus dem Serum-Inhibitorspiegel geht hervor, daß sich 3 Std. nach der Injektion ein Verteilungsgleichgewicht

eingestellt hat.

2.10.4. Vergleich der Verteilung der beiden Inhibitoren

Aus früheren (180, 181, 199, 200) Untersuchungsergebnissen geht hervor, daß bei der Ratte und auch beim Menschen die Nieren das Eliminationsorgan für den Trypsin-Kallikrein-Inhibitor Trasylol darstellen. Der Inhibitor wird dabei fast nicht mit dem Harn ausgeschieden sondern in der Niere im Verlauf von Tagen (181, 199) durch proteolytischen Abbau inaktiviert. Für die selektive Fixierung des Inhibitors in den Nieren ist nach den Ergebnissen von FRITZ (48) die starke Basizität dieses Inhibitors, dessen isoelektrischer Punkt bei pH 10,5 (187) liegt, ausschlaggebend.

Im Vergleich zu Trasylol fällt der Seeanemonen-Inhibitor-Spiegel im Serum langsamer - in der dritten Std. gleich dem Trasylol-Spiegel in der ersten Std. - und auch das Verteilungsgleichgewicht stellt sich erst 2 Std. später ein. Doch der entscheidende Unterschied zeigt sich bei den Inhibitorkonzentrationen in Niere und Harn. Beim Trasylol zeigt sich bis zur vierten Std. post inject. ein stetiger Anstieg der Inhibitorkonzentration in der Niere bis zu 80 % der injizierten Menge, und es erfolgt dann ein Abbau über Tage. Beim Seeanemoneninhibitor ergibt sich zwar auch ein Anstieg in den Nieren bis zur dritten Std., jedoch nur auf ca. 20 % der injizierten Aktivität. Dann setzt ein rascher Abbau ein, der den Inhibitorspiegel bis zur fünften Std. auf 2 % und bis zur 12. Std. auf ca. 0 % der dem Organismus injizierten Menge sinken läßt.

Dagegen werden nach der Injektion von Trasylol im Harn der Ratten insgesamt nur 2 % der injizierten

Aktivität ausgeschieden, während der Gehalt von Seeanemoneninhibitor im Harn nach 48 Std. bereits 85 % der injizierten Dosis beträgt.

Der Seeanemoneninhibitor erreicht demnach eine wesentlich niedrigere Konzentration in der Niere als Trasylool und wird auch bedeutend schneller im Harn aus dem Organismus entfernt. Diese Tatsache ist sicher ein Vorteil gegenüber Trasylool, wirkt er dadurch doch weder nierentoxisch noch in größerem Maß stoffwechselverändernd.

3. GESCHICHTE, CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN, PHARMAKOLOGIE UND ANWENDUNG DES HEPARINS

3.1. Geschichte und Vorkommen des Heparin

Heparin wurde von MC LEAN 1916 erstmalig aus Leber und Herz gewonnen und steht als Sammelname für ein in verschiedenen Organen vorkommendes Substrat. Seine Bildung in den EHRLICH-Mastzellen (135), die im perikapillären Gebiet reichlich vorkommen, wird durch den Sympathicus neurovegetativ gesteuert, und Heparin dient hier möglicherweise zur Neutralisation biogener Amine (95).

Bei seiner Speicherung geht es höchstwahrscheinlich mit Histamin eine nicht dialysierbare Verbindung ein (192, 195). Da außerdem Hypertensin, Histamin, Kallidin und anscheinend auch Thrombin (193) mit Heparin in vitro einen Komplex bildet, nimmt WERLE und JAKUES an, daß dieser Bildung von Heparin-Komplexen eine gewisse Bedeutung zusteht.

3.2. Chemische Eigenschaften

Heparin stellt eine polymere Verbindung dar aus D-Glucosamin, D-Glucuronsäure und Sulfatgruppen. Sein Mole-

kulargewicht beträgt etwa 17 - 20.000. Auf Grund der vielen Schwefelsäurereste ist Heparin die stärkste organische Säure, die im Säugetierorganismus vorkommt (109). Diese starken negativen Sulfatladungen sind auch für die gerinnungshemmende Wirkung und überhaupt für die Reaktion mit vielen Eiweißen, Enzyme eingeschlossen, notwendig, wobei der Mechanismus jedoch noch unbekannt ist.

3.3. Pharmakologie

3.3.1. Wirkung auf Gerinnungsfaktoren

Unterstützt durch Cortison oder Cortisol haben solche negativen Ladungsträger auch eine Stabilisierung des Gefäßendothels und der Thrombozyten zur Folge (135). Das äußerst wirksame Antikoagulans Heparin wirkt zusammen mit einem Plasma - Co - Faktor vorwiegend als Antithrombin, Antithromboplastin und hemmend auf die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin (22).

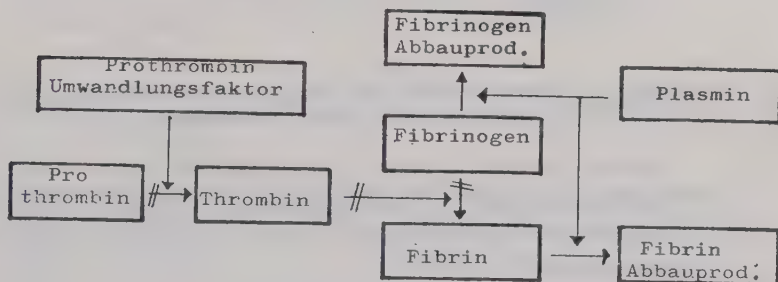


Abb. 17: Blutgerinnung, Fibrinolyse und die Hemmung einiger Gerinnungsfaktoren durch Heparin

Zu beachten ist, daß neben der Antithrombinwirkung ein bereits bei niedriger Heparindosierung nachweisbares Eingreifen in die Vorphase der Gerinnung stattfindet

(211). Ferner hemmt Heparin die Retraktion, löst eine Thrombozyteninsuffizienz aus und vermindert möglicherweise auch Prothrombin und den Faktor VII. Daneben inhibiert es Hyaluronidase, Lysozym, Ribonuclease, Phosphatase und Trypsin.

3.3.2. Wirkung auf Kinine

Der Effekt des Heparin auf die kininbildende Aktivität verschiedener Proteasen wurde von BACK und STEGER untersucht (9). Danach wird menschliches Plasmin von der gleichen Heparindosis weit weniger, das heißt zu 13 - 18 %, gehemmt als menschliches Plasmakallikrein das immerhin zu 80 % gehemmt wird.

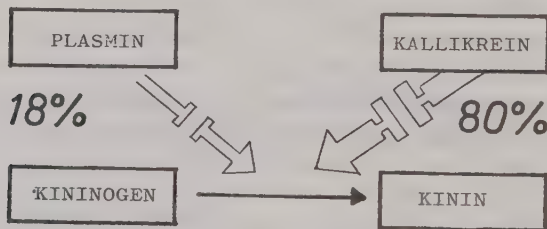


Abb. 18: Hemmwirkung von Heparin in % auf die kininbildende Aktivität von Plasmin und Kallikrein

Jedoch wurde die kininbildende Aktivität von Trypsin und Plasmin durch therapeutische Heparindosen nicht beeinflusst. Beide Enzyme bilden Kinin aus passenden Substanzen (6, 7).

3.4. Mikrozirkulation und Heparin

Auch besitzt Heparin als Aktivator und Co-Faktor des Klärfaktors Lipoproteinlipase, der Chylomikronen aus dem Blut entfernt (53), eine gewisse Klärwirkung auf lipämisches Blut. Ebenfalls kommt Heparin eine gerin-

ge thrombenaufhebende Wirkung zu. So kann bei der intravasalen Gerinnung, wenn man an die Fibrin-Thrombozyten-Aggregate denkt, eine Wirkung erzielt werden (75, 76). Die Verbesserung der Mikrozirkulation, die sich im Verlaufsprofil der Gerinnungsfaktoren wieder spiegelt, bestätigt dies.

Prophylaktisch kann Heparin, dieser Nachweis ist nach POPOV erbracht (152), eine Hyperkoagulabilität und damit eine intravasale Gerinnung verhindern (sh. Abb. 19).

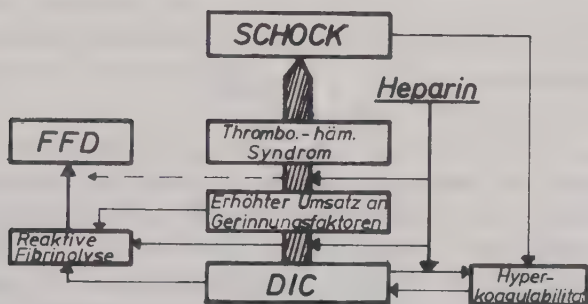


Abb. 19: Wirkungen des Heparin (aus: Neue Aspekte der Trasylof Therapie, Bd. 5, Schattauer-Verlag, 1972)

Eine bemerkenswerte Hemmung des Renin mit einer Heparindosis kleiner als fünf uniten/ml wurde von SEALY erreicht (170).

3.5. Heparin bei Verbrennungen

Abschließend in diesem Zusammenhang möchte ich noch auf die Anwendung des Heparins bei Verbrennungen eingehen, dessen Wirkung wir in unserer Arbeit anhand der Überlebenszeit zu prüfen versucht haben.

Schon MC CLEERY (29), PARSONS (148), ELROD (41), GREEN und ARTZ (57) hatten in ihren Veröffentlichungen auf günstige Therapieeinflüsse durch Heparin hingewiesen. Besonders bemerkenswert ist der Bericht von SALIBAR (164): Ihre Patienten mit unterschiedlich großen Verbrennungsflächen und Graden wurden mit sehr großen Heparindosen therapiert.

Heparin linderte den Schmerz und verhinderte die Wundenausdehnung, so daß die anfängliche Wundgröße auch die größtmögliche blieb. Es entwickelten sich keine Ödeme, Intoxikationen oder Schocksymptome, auch tauchten seitens der Blutgerinnung keine Probleme auf. Revaskularisation, Granulation und Reepithelisation ohne Hautspannung, Infektion und Transplantat wurden beschleunigt.

Dabei zeigt sich der Heparineffekt dosisabhängig. Je größer die Dosis, desto mehr ließ der Verbrennungsschmerz nach; er erschien SALIBAR als ein guter Anhaltspunkt für die richtige Heparindosierung. Bei Verbrühungen ermittelte er eine empfehlenswerte Dosis von 375 - 400 E/kg (Körpergewicht) pro 15 % (Verbrennungsfläche) von Heparin-Depot in den ersten 24 Stunden. Bei Verbrennung lag seine ideale Dosis noch höher - bei 400 - 1200 E/kg und 15 % Verbrennungsfläche.

Der praktische Nutzen ist, daß die benötigte Heparindosis direkt berechnet werden kann vom Verbrennungstyp, Größe und Schweregrad. Weitere Dosiserhöhungen zeigten keinen günstigeren klinischen Effekt.

4. PATHOPHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER PROTEINASENINHIBITOREN UND DES HEPARIN IM VERBRÜHUNGSSCHOCK

4.1. Proteolytische Fermente

Wie im vorigen Kapitel erwähnt, wirken proteolytische Vorgänge polyvalent auf das krankmachende Geschehen nach Verbrennungen. Abb. 20 zeigt das Aktivierungsschema der proteolytischen Fermente im Blutkreislauf nochmal recht übersichtlich, im Besonderen das der Profibrinolysokinase.

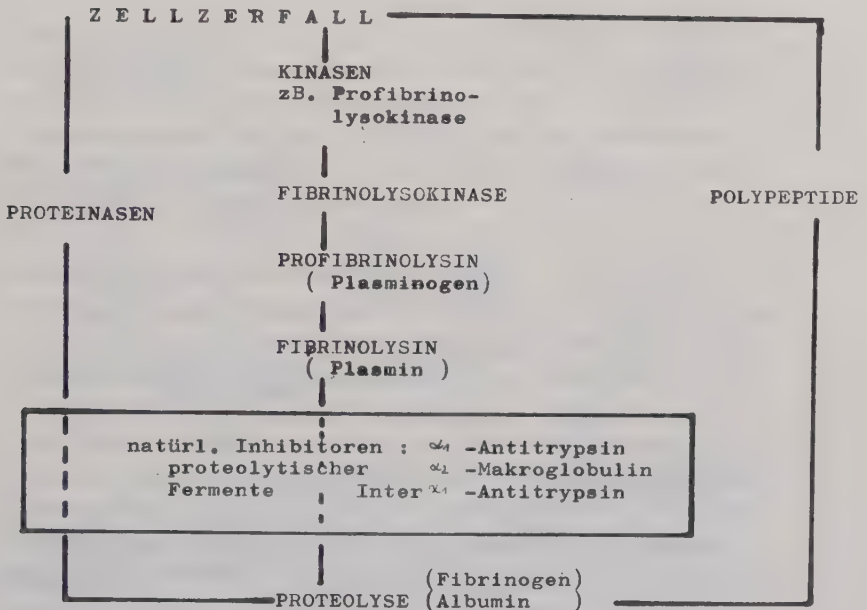


Abb. 20: Aktivierungsschema des Plasmins

Die im Zellerfallsvorgang freigesetzte oder durch den HAGEMANN-Faktor aktivierte Profibrinolysokinase bewirkt über Fibrinolysokinase eine Aktivierung von Plasminogen zum Plasmin.

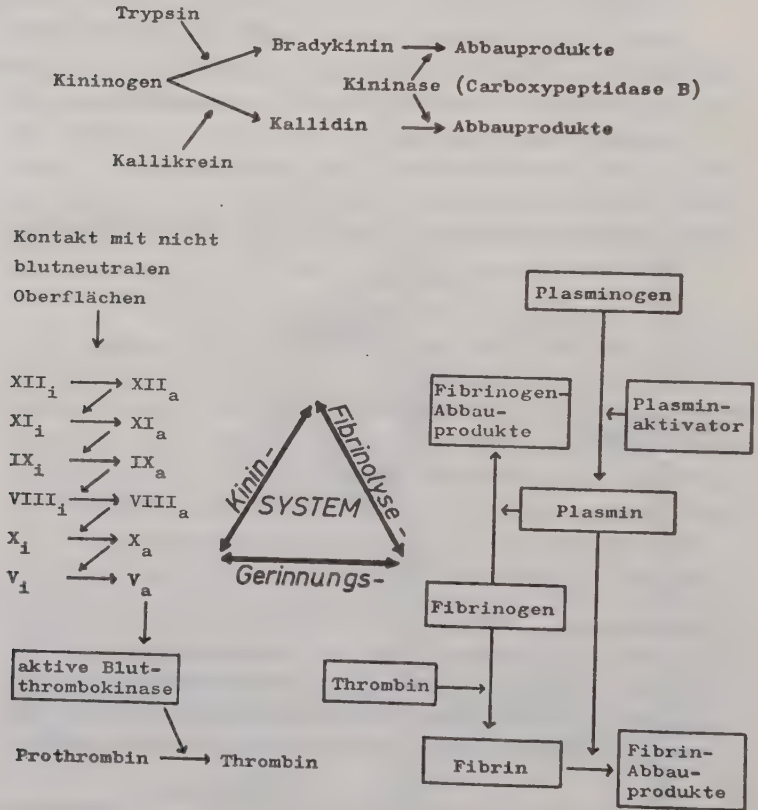


Abb. 21: Zusammenspiel von Kinin-, Gerinnungs- und Fibrinolysesystem

Abb. 21 zeigt, daß Plasmin auch autokatalytisch aus Plasminogen entstehen kann, und sie verdeutlicht das Zusammenspiel der verschiedenen Systeme (Kinin-, Gerinnungs- und Fibrinolyse-System).

GREUER wies nach, daß die freigesetzten Proteinasen die zelleigenständigen Vorstufen proteolytischer Fermente in der Leberzelle aktivieren und ihre Abgabe ins Blut veranlassen können.

Auch beim gesunden Menschen finden ständig physiologische Zelluntergänge statt. Die Wirksamkeit der hierbei entstehenden proteolytischen Fermente wird jedoch durch die bereits erwähnten im Blut befindlichen natürlichen Proteinaseninhibitoren neutralisiert. Kommt es aber, wie bei der Verbrennung, zu einem vermehrten Zelluntergang und damit zu einem überschießenden Angebot proteolytischer Fermente, so ist es möglich, daß die im Plasma vorhandenen Inhibitoren proteolytischer Fermente verbraucht bzw. überspielt werden.

4.2. Inhibition proteolytischer Fermente

In diese für den Organismus gefährlichen Reaktionsabläufe kann mit einer Substitutionstherapie eingegriffen werden, und zwar mit Inhibitoren, die intravenös zugeführt werden. Der hierbei eingesetzte bisher am besten untersuchte Proteinaseninhibitor Trasylol besitzt ein breites Wirkungsspektrum (sh. Abb. 22). Trasylol hemmt Proteinasen mit proteolytischer und esterolytischer Wirkung. Hierzu gehören Kallikrein, Chymotrypsin, Plasmin, Plasminaktivator, Plasmafaktoren in der Gerinnungsvorphase, Gewebs- und leukozytäre Proteinasen (187).

Die Hemmung der proteolytischen, esterolytischen und kininliberierenden Aktivität dieser Enzyme erfolgt in der Form, daß sich der Hemmbezirk des Inhibitor-moleküls an das aktive Zentrum des jeweiligen Enzyms anlagert.

Es bildet sich ein reversibler, inaktiver Enzym-Inhibitor-Komplex im Molverhältnis 1 : 1 (WERLE, 1969).

Der Hauptanteil des Gerinnungshemmeffektes besteht in der Hemmung der Entstehung der aktiven Blutthrombokinasen aus Plasmafaktoren, Serumfaktoren, Kalium und Thrombozytenfaktor. Trasylol hemmt den aktiven Faktor IX und unvollkommen die aktiven Faktoren V und X.

Bei der Verbrauchskoagulopathie ist nach HERSCHLEIN und STEICHELE Trasylol im Vergleich zu synthetischen Inhibitoren wie EAC, AMCH und PAMBA der geeignete Inhibitor (81). Dies bestätigt auch RITTER (157), der sagt, daß die antithromboplastische Wirkung des Trasylol, wenn auch in 3 - 5facher Dosis, verglichen mit der antifibrinolytisch wirksamen Menge, zunächst den Nachstrom thromboplastischen Materials bremst. Die anschließende Inhibition der überschießenden aktivierten Fibrinolyse stellt aber keine Gefahr mehr dar. Weiterhin empfehlen RITTER sowie HÜNNEMEYER (87) zur Therapie der disseminierten intravasalen Gerinnung die Kombination von Trasylol mit Heparin.

Diese Kombination vermag die Gefahr der intravasalen Gerinnung, gefolgt von der reaktiven Fibrinolyse, den Symptomen des Verbrennungsschocks, herabzusetzen (MATIS, 1969).

4.3. Wirkung des Heparins

Bezüglich der pathophysiologischen Bedeutung des Heparins ist bekannt, daß es die Neutralisation von Thrombin durch Antithrombin III katalytisch beschleunigt und dadurch eine Rethrombosierung verhindert. Zusätzlich wird durch die Injektion von Heparin eine Lipoproteinlipase freigesetzt, die wegen ihrer Wirkung auch als "clearing-factor" bezeichnet wird (2, 78, 102, 103, 104, 105).

Ferner hemmt Heparin die Wirkung von Thromboplastin und

Thrombin sowie die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin. Es verhindert damit eine weitere Fibrinogenverarmung und durchbricht nicht zuletzt dadurch bis zu einem gewissen Grade den latenten oder akuten Schockzustand (22).

Ergebnisse anderer Autoren stützen diese These (45, 71, 128) oder heißen die Anwendung von Heparin bei Hyperkoagulabilität nicht gut (124, 173, 202). KAULA (97) verhinderte in vitro mit hohen Heparindosen die Fibrinolyse und beschleunigte sie mit kleinen Konzentrationen, während in anderen Arbeiten von einer Unterstützung der fibrinolytischen Aktivität des Plasmins durch Heparin (69) oder einer Hemmung dieser Aktivität (4, 101) berichtet wird. Andere Veröffentlichungen zeigen die Hemmung folgender Proteinasen durch Heparin:

Trypsin (55, 86, 188), Pepsin (119), Thrombin (147) und menschliches Plasmakallikrein (31).

4.4. Heparin kombiniert mit Trasylol

Heparin hemmt Thrombin sowohl hinsichtlich seiner Gefäßwirkung als auch seiner gerinnungsaktivierenden Wirkung, wozu Trasylol nicht in der Lage ist.

HABERLAND, KOSLOWSKI und MATIS (63) empfehlen eine Heparinisierung in der Schockbehandlung nur in Verbindung mit dem Proteinaseinhibitor Trasylol. Durch die heparinbedingte Gerinnungshemmung wird die Permeabilität der Kapillaren gesteigert. Dieser hier negative vasotrope Effekt läßt sich durch Trasylol verringern (131).

Inwieweit noch andere Wirkungen des Heparins von Bedeutung sind, etwa die Aufhebung einer Sperre der Thrombopoese oder die Hemmung der Synthese des Aldosterons in der Nebenniere, weiß man bisher nicht konkret.

4.5. Effekte des Trasylol im Experiment

Für die pathophysiologische Bedeutung der Inhibitoren erwähnenswert sind aber noch einige Wirkungen des Trasylols. LUDWIG und TAUBER fanden 1969 das Lungenödem als Schockfolge nach Hyperthermie bei Ratten dosis- und zeitabhängig unter Trasylol vermindert. Kreislaufdynamisch bewirkt Trasylol eine Erweiterung des arteriellen und eine Kontraktion des venösen Gefäßbettes mit Ökonomisierung von arterieller Durchblutung und venöser Strömungsgeschwindigkeit sowie Stimulation des Venentonus.

Dadurch wird die Kapillardurchblutung heraufgesetzt, die arterielle Sauerstoffaufnahme verbessert und der Sauerstoffpartialdruck erhöht.

Da Trasylol auch in ischämisch-hypoxisch geschädigten Geweben freigesetzte Proteinasen hemmt, verhindert es die Bildung und Freisetzung toxischer Polypeptide, darunter u.a. des Myocardial Depressant Factors (56, 114, 115) und des Pulmonary Lesion Factors (CLOWES 30, 44).

Nach GLENN und LEFER stabilisiert Trasylol auch die Membranen der Lysosomen, so daß diese lysosomalen Proteinasen nicht liberiert werden (117). Ferner unterbindet Trasylol auch Lungenläsionen indem es Trypsin hemmt. Trypsin ist nach WERLE Mediator der Aktivierung von Lipase, die als Prolipase in den Alveolarsepten gespeichert ist.

Aktivierte Lipase bedingt die Hydrolyse des Neutralfettes. Freie Fettsäuren zerstören nun im Direktkontakt den Antiplateletsefektor der Lunge, also den Schutzfilm aus Protein und Phosphorlipiden, der dem Alveolarendothel aufliegt und die Alveolen stabilisiert. Ferner deformieren nach SCHÜTTERLE (169) freie Fettsäuren die Erythrozyten, die dann die Mikrozirkulation behindern.

BLÜZOW beobachtete bei der Hitzeexposition von Ratten auch eine deutliche Senkung des Neutralfettspiegels nach

Gabe von Trasylol (25). Die Beziehung von Trasylol zur Thrombozytenaggregation hat HEIDEMANN (77) untersucht. Er fand, daß Trasylol der Plättchenaggregationen entgegenwirkt und das deshalb weniger "trapping" von Thrombozyten-Mikroembolie in der Lunge stattfindet.

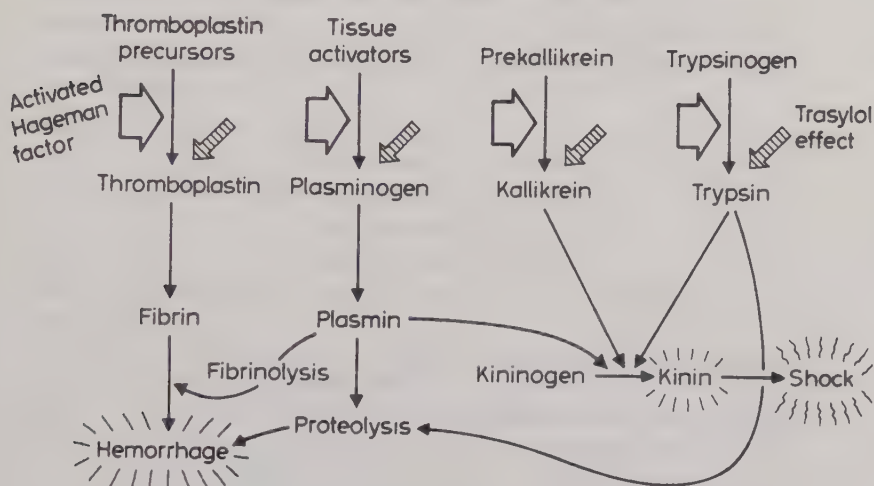


Abb. 22: Korrelation und Aktivierung verschiedener Proteinasen sowie der angenommenen Trasylol Effekt (aus: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 3, Schattauer-Verlag, Stuttgart)

Die bislang aufgeführten Effekte des Trasylols, der anti-koagulatorische (21, 130) und der antifibrinolytische (154) als Haupteffekte sowie der metabolisch alkalisierende (123, 182), der antiödematöse (38, 62, 94), der hämodynamische (20, 149) und der Fettklärungseffekt (83, 88), beruhen sämtlich auf der Tatsache der Proteinaseinhibition einiger biochemischer Systeme durch Trasylol.

Ein ähnlich breites Wirkungsspektrum erhoffen wir auch von den neuen polyvalenten Proteinaseninhibitoren für Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein aus der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*) und aus der Seeanemone (*Anemonia sulcata*).

B.

VERBRÜHUNGSSCHOCKMODELL, EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

1. DAS VERBRÜHUNGSSCHOCKMODELL

Um die komplexen Wirkungen des neuen Inhibitors aus Seeanemonen und des Heparins zu testen und mit der therapeutischen Wirksamkeit des Trasylol vergleichen zu können, wählten wir aus den verschiedenen Schockmodellen, wie zum Beispiel

- sept. Schock,
- Entblutungsschock,
- Dextranschock,
- Endotoxinschock,
- Peritonitisschock,

das Verbrühungsschockmodell aus, da es folgende Vorteile bietet:

1. Relativ geringer labortechnischer, operativer Aufwand;
2. Exakte Reproduzierbarkeit der Verbrühung;
3. Große Versuchsserien in relativ kurzer Zeit;
4. Statistische Auswertbarkeit und Verifizierbarkeit bei genügend großen Versuchsserien;
5. Überlebensrate (in %) und Überlebenszeit sind exakt zu bestimmen und trotz ihrer Einfachheit die wichtigsten therapeutisch deutbaren Kriterien.

Außerdem lassen sich die Versuchsergebnisse weitgehend auch auf andere Schockformen übertragen, da sich bei allen Schockformen nach einer gewissen Anlaufzeit die gleichen Grundmechanismen abspielen (HABERLAND: Prinzip der gleichen Endstrecke).

Des weiteren brachten Therapieversuche mit Inhibitoren bei anderen Schockmodellen sehr stark voneinander abweichende Ergebnisse und waren damit quantitativ schlecht auswertbar. Das Überhitzungsmodell erwies sich diesbezüglich als wesentlich günstiger.

Zur Erzielung eines Verbrennungstraumas sind in der Literatur verschiedene Modelle beschrieben:

- Verbrennung mit einem Brandeisen (BROOKS, 24);
- Verbrennung mittels Lichtbogen (PEARS und KINGSLEY, 150);
- Verbrennung mittels Bunsenbrennerflamme (GRISOLA, 61);
- Verbrühung mit heißem Wasser (Mc. CARTHY - 1945, ARTURSSON - 1964, SCHILDT und NILSSON, 166).

Die Verbrühung ist die am häufigsten gewählte Methode, um einen experimentellen Verbrennungsschock zu erzeugen, da hierbei die Verbrennungsfläche (Eintauchtiefe) und der Verbrennungsgrad (Verbrennungszeit, Temperatur) gut kontrollierbar sind. Außerdem ist es die einfachste Art und Weise, die partielle Verbrennung - eben durch Eintauchen in heißes Wasser - bei einer Ratte zu erzielen.

Wie bei den Ausführungen über die Verbrennungskrankheit beschrieben, werden dabei im menschlichen Körper 3 Systeme aktiviert:

1. Das Kininsystem,
2. das Gerinnungssystem und
3. das Fibrinolysesystem.

Außerdem werden Gewebsproteasen freigesetzt. Die neuen Inhibitoren, die wir getestet haben, sind in ihrer Wirkung polyvalent; d.h. sie wirken auf alle drei aufgeführten Systeme.

Um einen Verbrennungsschock zu erzielen, muß man ausgedehnte Hautflächen verbrühen. Da wir der Literatur entnehmen konnten, daß es beim Eintauchen der Tiere in heißes Wasser bis zur Hüfte oder zur Axilla zu unerwünschten Schädigungen an Schwanz, Pfoten sowie an der urethralen und analen Öffnung kommt, wählten wir die von Mc. CARTHY 1945 entwickelte Methode der "back-burn-procedure", also des Eintauchens des Rückens der Tiere. Mit dieser

Methode konnte die fragwürdige Hitzeeinwirkung auf den Bauch und damit auf die Därme der Tiere, was die Freisetzung von Endotoxinen aus den Darmbakterien zur Folge hat, vermieden werden. Diese Endotoxine können die hitzegeschädigte Darmwand durchdringen und bringen damit einen nicht kontrollierbaren unerwünschten Faktor mit ins Spiel.

Außerdem bleiben bei der von uns gewählten Methode die Extremitäten funktionsfähig, und das Tier behält somit seine Bewegungsfreiheit. Auch sind die Funktionen der Ausscheidungsorgane nicht beeinträchtigt. Ferner können die Tiere auch nicht das verbrühte Gewebe selbst anfresen, was zusätzliche Traumen verhindert.

Als sehr wichtig ist abschließend zu vermerken, daß die Injektionsmöglichkeit (i.p. oder i.v.) erhalten bleibt.

1.1. Versuchstiere

Als Tiermaterial dienten ca. 600 Albinoratten. Es handelte sich bei ihnen ausschließlich um jungfräuliche weibliche Tiere vom Sprague-Dawley-Stamm. Sie stammten von der Versuchstierzuchtungsanstalt Bäumler in Wolfratshausen bei München.

1.2. Haltung und Fütterung der Tiere

Die Ratten wurden jeweils eine Woche vor dem Versuchstag geliefert und bis zur Schocksetzung in Sammelkäfigen in Gruppen von ca. 20 Stück im Tierstall gehalten. Sie erhielten Altromin-Standard-Futter (Altrogge-Kraftfutter GmbH, Lage/Lippe). Bis 24 Stunden vor Versuchsbeginn standen Futter und Wasser ad libidum zur Verfügung.

Die Raumtemperatur betrug durchschnittlich 27° C (Schwankungen zwischen 25° C und 29° C), da HORST, MENDEL und BENEDICT festgestellt haben, daß bei dieser Temperatur die geringste Stoffwechselrate bzw. ein Zustand des Temperaturgleichgewichts vorherrscht. Nach der Verbrühung

wurden die Tiere in durchsichtigen Makrolon-Einzel-Käfigen gehalten, um Kannibalismus zu vermeiden und genaues Kontrollieren zu ermöglichen.

1.3. Vorbereitung der Tiere für den Versuch

Eine Stunde vor Beginn des Experiments wurde die benötigte Anzahl von Tieren mit einem Gewicht von 200 ± 5 g aussortiert. Etwa 45 Minuten vor dem Versuch wurden die noch ungeschorenen Tiere jeweils mit 2 ml 3,6 %igem Chloralhydrat, verdünnt mit 5 ml Ringer-Lösung pro Ratte, narkotisiert. Chloralhydrat wurde als Anästhetikum gewählt, da bei der Äthernarkose, wie sie MC CARTHY und MILES benutzten, eine genaue Kontrolle der Applikationsmenge nicht möglich ist. Diese Lösung wurde intraperitoneal mit sterilen Spritzen und Kanülen injiziert.

In narkotisiertem Zustand wurden den Tieren anschließend der Rücken und bis auf einen schmalen Streifen auch der Bauch mit einer elektrischen Friseur-Scher-Maschine kahl rasiert. Anschließend wurden sie mit dem Enthaarungsmittel Pilca enthaart. Um eine Unterkühlung der nackten Tiere zu verhindern, wurden sie in einem Plastikbehälter mittels eines Heizstrahlers warm gehalten.

In umfangreichen Vorversuchen hatten wir festgestellt, daß ein zusätzliches Enthaaren nach dem Scheren für ein exaktes Ergebnis unerlässlich ist; denn in dem nach der Schur noch verbleibenden Haarpolster setzen sich Luftblasen fest, die dort, wo sie auftreten, als eine Art Isolierschicht wirken. Da wir beabsichtigten, eine über die gesamte Verbrühungsfläche gleichmäßige Temperatureinwirkung zu erzielen, benutzten wir das Enthaarungsmittel Pilca, wodurch gleichmäßiger Wasserkontakt gewährleistet war. Aber erst durch Zusatz eines Detergentiums in das Laborwasserbad erreichten wir die von uns erwünschte Konstanz der Temperatureinwirkung auf die Verbrühungsfläche.

1.4. Versuchsbeschreibung

Da die Verbrühungsmethode von MILES und MC CARTHY keine genau kontrollierbare Eintauchtiefe und kein konstantes Verbrennungsfeld gewährleistet und außerdem noch mit negativen Nebenwirkungen, wie im Abschnitt B.1. beschrieben, belastet ist, gingen wir folgendermaßen vor:

Die an Vorder- und Hinterbeinen mittels Leukoplast gefesselte Ratte wurde auf eine gebogene Kramerschiene gespannt, der Kopf ebenfalls mit Leukoplast unverrückbar auf der Schiene justiert und der Schwanz zwischen den Hinterfüßen hindurchgezogen. Der Abstand zwischen den zwei bestimmten Sprossen der Kramerschiene, an die die Vorder- und Hinterfüße gefesselt waren, wurde vor jedem Versuch gemessen, um so eine weitgehend gleichmäßige Spannung der Rückenhaut zu gewährleisten. Zur Kontrolle der Eintauchtiefe benutzten wir anatomische Merkpunkte (schmäler Streifen des stehengelassenen Fells an der Bauchseite u.a.m.), sowie die Tatsache, daß sich die Kramerschiene gerade noch über der Wasseroberfläche zu befinden hatte. So gelang es uns, ein konstantes Verbrennungsfeld von ca. 38 % Körperoberfläche zu erreichen. Das Verhältnis verbrühter zu unverbrühter Körperoberfläche wurde in % der Gesamtoberfläche bestimmt, die nach der Formel von LEE berechnet wurde:

$$A = K \times W^{2/3}$$

(A = Oberfläche in cm^2 ,
W = Körpergewicht in Gramm,
K = 10)

Die Verbrühungsfläche wurde bestimmt, indem der Umfang des verbrannten Areals auf ein Stück entwickelten Röntgenfilms aufgetragen und ausgeschnitten wurde. Mit der Analysenwaage wurde im Verhältnis zu einer bekannt grossen Vergleichsfläche die cm^2 -Zahl bestimmt.

Die Verbrühung des Rückens der Ratte selbst wurde bei konstanter Temperatur von 93°C in einem Laborwasserbad

vorgenommen. Der schon erwähnte Zusatz von Detergentien sicherte die angestrebte gleichmäßige Benetzung; die Wassertemperatur wurde mittels Thermostat und Umwälzanlage (elektrisch betriebener Quirl) konstant gehalten.

Die Verbrühungszeit wurde mit einer Stoppuhr kontrolliert und betrug bei 93°C Wassertemperatur exakt 30 Sek. Wir wählten diesen hohen Temperaturwert, da schon eine geringe Herabsetzung der Wassertemperatur um 2°C zu erheblich längeren Überlebenszeiten und bei weiterer Verminderung zum Überleben beinahe sämtlicher Tiere führte.

In Vorversuchen hatten wir ermittelt, daß die Tiere unter diesen Bedingungen nach 14 Stunden zu 100 % starben und die mittlere Überlebenszeit 6 Stunden und 30 Minuten betrug.

Beim Anfertigen der Überlebenszeit-Kurven, die wir für die Auswertung der Statistik benötigten, fiel auf, daß die kritische Phase innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Verbrühung lag, d.h. die Tiere starben entweder in dieser Zeit oder überlebten danach mit wenigen Ausnahmen.

HABERLAND (65) beschrieb, daß bei Schockversuchen mit Ratten eine meteorologische Abhängigkeit dieser Tiere zum Ausdruck kommt. Auch wir konnten im Laufe unserer Versuche feststellen, daß die Versuchstiere zeit- und wetterabhängig verschieden reagierten und diese Unterschiede zu wesentlichen Auswirkungen auf die Versuchsergebnisse führten.

So beobachteten wir an einem Versuchstag im November, an dem für die Jahreszeit viel zu hohe Temperaturen, Tiefdruck und Regen herrschten, daß ein sehr hoher Prozentsatz der Tiere weit vor der Zeit starb. Um auch diese äußeren Faktoren möglichst konstant zu halten, legten wir unsere Versuche nun auf Tage mit ähnlicher und

stabiler Wetterlage.

Auch die Tatsache, daß wir ausschließlich jungfräuliche weibliche Ratten verwandten, entsprach unserem Bestreben, die Versuche möglichst weit zu standardisieren, da wir aus der Literatur von BACK (8) wußten, daß weibliche Tiere in ihrem Hormonhaushalt, was die Verbrennungskrankheit betrifft, wesentlich konstantere Werte aufweisen als männliche. Außerdem wies BACK auch auf die große Bedeutung der Gewichtskonstanz bei den einzelnen Versuchstieren hin.

Unsere Bemühungen, die Versuche unter möglichst gleichen Bedingungen stattfinden zu lassen, gingen soweit, daß bei den einzelnen Schritten des Versuchsablaufs (z.B. Anästhesieren, Rasieren, Verbrühen, usw.) jeweils die gleiche Person die gleiche Tätigkeit ausübte.

2. DURCHFÜHRUNG DER VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCHE

Jede Untersuchungsreihe zog sich über mehrere Tage hin, währenddessen die Tiere ständig zu beobachten waren. Die Vorbereitung der Tiere zur Verbrühung und diese selbst konnte aufgrund des technischen Ablaufes nur zu zweit durchgeführt werden. KWIECINSKI und ich führten daher sämtliche Experimente im Rahmen einer Arbeitsgemeinschaft durch.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte getrennt nach Stoffgruppen.

Diese Arbeit beschreibt die Versuche mit Seeanemoneninhibitor, Heparin und einen Teil der Trasylolversuche.

Es kam uns in unseren Untersuchungen weniger darauf an, den therapeutischen Wert von Trasylol zu bestätigen. Dieses Pharmaka wurde bereits von zahlreichen Forschern in vielen Untersuchungen eingehend getestet. Wir woll-

ten vielmehr neue polyvalente Proteinaseninhibitoren und Heparin als Antikoagulans im Vergleich- und in Kombination mit dem bekannten und bewährten Inhibitor Trasylol testen. Außerdem sollten große Versuchsreihen die Möglichkeit statistischer und histologischer Auswertungen gestatten.

Bei der Wahl des APPLIKATIONSZEITPUNKTES beschränkten wir uns auf einen Zeitpunkt 10 Min. vor der Verbrühung, da nur so eine ausreichende und gleichmäßige Resorption und Verteilung des Pharmakons gewährleistet schien. Denn unmittelbar nach der Verbrühung kommt es zu einer überschießenden Freisetzung von Proteinasen aus geschädigten Lysosomen. Bereits zu diesem Zeitpunkt sollte sich der Inhibitor im geschädigten Organismus gleichmäßig verteilt haben und ein hoher Trasylol-Gewebsspiegel in den Tubulusepithelien bestehen. Gute Ergebnisse nach prophylaktischer Gabe von Trasylol bestätigte in seinen Untersuchungen auch BÜTZOW.

Wird der Inhibitor erst nach der Verbrühung intraperitoneal verabreicht, so kommt es nicht mehr zu einer ausreichenden Resorption aus dem Intraperitonealraum.

Die verabreichte Inhibitormenge wird unter dieser Bedingung nicht voll wirksam und ein großer Teil der Tiere starb unmittelbar nach der Verbrühung oder mußte mit einem speziell hierzu entwickelten Gerät beatmet werden.

Mit der Applikation *n a c h* der Verbrühung wären also konstante Versuchsbedingungen nicht erfüllt gewesen.

In Vorversuchen zur Ermittlung der günstigsten APPLIKATIONSART ergab sich beim Vergleich der i.v. und i.p. Applikation zumeist kein signifikant besseres Ergebnis für die eine oder andere Methode. Da die i.v. Injektion in die Schwanzvene der Ratte zu zeitlichen Verschiebungen des Versuchsablaufs führte, wählten wir ausser in der Heparin-Versuchsserie ausschließlich die in-

traperitoneale Applikation. Somit war ein exakter Versuchsablauf und die Einhaltung der Versuchsbedingungen besser gewährleistet.

Als Auswertekriterien wurden von uns folgende Parameter herangezogen:

1. Überlebensrate,
2. Überlebenszeit und
3. Histologische Veränderungen der wichtigsten Organe.

In den ersten 24 Stunden nach der Verbrühung wurden die traumatisierten Ratten halbstündlich beobachtet, was Atmung, Temperatur, Durchblutung der Ohren und des Schwanzes anbelangt; anschließend bis zur 36. Stunde stündlich, danach alle 3 Stunden.

3. I. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

Heparin / Trasylol

Trasylol wird bereits seit zwanzig Jahren erfolgreich zur Therapie und Prophylaxe verschiedener Schockformen eingesetzt.

Wie bereits beschrieben, beruht die günstige Wirkung unter anderem auf einem Hemmeffekt auf Plasmin, einer Plasminogen-Aktivierung und der Aktivierung von Plasmafaktoren in der Vorphase der Gerinnung.

Im Vergleich dazu besitzt Heparin (Liquemin) eine andere Wirkung auf eine Gerinnungsstörung im Gefolge eines Schockgeschehens. Nach einer schweren Verbrennung kommt es zu einer Verbrauchskoagulopathie mit dem Auftreten disseminierter Mikrothromben. Eine der Verbrühung vorausgehende s.c. Gabe von Heparin sollte diesen Anteil am Schockgeschehen verhindern oder abschwächen können und so ebenfalls wie Trasylol die Überlebenszeit verlängern.

Eine Gruppe Trasylol behandelte Tiere diente in diesem Versuch gewissermaßen als Standardparameter zu einer mit Heparin therapierten Tiergruppe.

3.1. Methodik

Anzahl der Versuchstiere : 40 jungfräuliche
Sprag-Dawl. Ratten

Trasylol-Gruppe : 20 Ratten

Heparin-Gruppe : 20 Ratten

Gewicht der Tiere : 200 ± 5 gr

Verbrühungsdauer : 30 sec

Verbrühungstemperatur : 93° C

Sämtliche Tiere waren 90 Minuten vor ihrer Verbrühung mit 2 ml Chloralhydratlösung narkotisiert worden. Zusätzlich gaben wir 5 ml Ringlösung als Flüssigkeitsdepot.

Gleichzeitig mit der i.p. verabreichten Narkose applizierten wir den 20 Tieren der einen Gruppe 1000 USP/kg Heparin subcutan.

Wir wählten diesen frühen Applikationszeitpunkt, um bei der subcutanen Injektion einer vollständigen Resorption des Substrats und Vollheparinisierung sicher sein zu können. Eine intraperitoneale Gabe von Heparin hätte die Versuchsreihe erheblich verfälscht.

Wir konnten feststellen, daß bei intraperitonealer Injektion von Heparin einige Tiere nach der Verbrühung in das Abdomen bluteten. Höchstwahrscheinlich war wegen der Heparinisierung die durch die Kanüle gesetzte Stichwunde nicht völlig geschlossen.

Die übrigen 20 Tiere, der zum Vergleich herangezogenen Gruppe, erhielten jeweils 10 Minuten vor ihrer Verbrühung 100.000 KIE/kg Trasylol intraperitoneal injiziert.

3.2. Resultate

Sieht man sich die Anzahl der in den ersten 5 Stunden nach der Verbrühung gestorbenen Ratten beider Gruppen im Vergleich zur Kontrollserie an, so fällt auf, daß in der Liquemin- und Trasylolgruppe nur jeweils eine Ratte verendete, in der Kontrollgruppe dagegen bereits 9 Tiere.

Im zweiten entscheidenden Zeitabschnitt nach der Verbrühung starben in der Liquemingruppe 4 Tiere, in der alternierend verbrühten Trasylolgruppe dagegen 7 Tiere. Bis zur 10. Stunde ist die Mortalität der Liquemingruppe gegenüber der Trasylolgruppe also erniedrigt.

In dem Intervall von der 10. bis zur 15. Stunde verenden in der Trasylolgruppe nur 3 Tiere, während die Liquemingruppe 6 Tiere verliert.

Die Liquemin- und Trasyloltiere haben also bis zur 15. Stunde die gleiche Überlebensrate erreicht.

Betrachtet man die Kurven (S. 71) so fällt auf, daß die stärkste Absterberate der mit Liquemin behandelten Ratten zeitlich versetzt zur Trasylolgruppe, d.h. etwas später einsetzt.

Wie vor schon erwähnt, gleicht sie sich dieser bis zur 15. Stunde an.

Bis zur 50. Stunde nach Traumasetzung sterben in beiden Gruppen noch jeweils 2 Tiere.

Insgesamt sind in jeder Gruppe 13 Tiere gestorben, was einer Mortalität von 65 % entspricht.

3.3. Statistik

Sämtliche Versuche wurden von uns statistisch nach dem modifizierten WILCOXON-MANN-WHITNEY-Test ausgewertet. In diesem Signifikanztest für zwei zensierte Stichproben gehen sowohl die variable Überlebenszeit, als auch

die variable Überlebensrate ein.

Für rechnerische Einzelheiten sei auf die Publikation im Journal of the American Statistical Association S. 125 - 138, Band 50 (1960) verwiesen.

Die Aussagekraft der statistischen Auswertung unserer Ergebnisse wird begrenzt durch die Anzahl von 20 Tieren pro Gruppe bzw. 40 Tieren je Serie.

Im Vergleich zu ähnlichen tierexperimentellen wissenschaftlichen Arbeiten sind diese Tierzahlen jedoch ausreichend groß.

Der Test wurde nach 60 Std. abgebrochen, d.h. die bis dahin noch nicht gestorbenen Tiere wurden als Überlebende gewertet. Als Signifikanzgrenze wählten wir ein 5 % Niveau, entsprechend einem Testergebnis von

T - 1,645

T - 1,965 Signifikanz auf dem 2 % Niveau

T - 2,326 Signifikanz auf dem 1 % Niveau

Kein signifikanter Unterschied liegt vor, wenn die T-Werte zwischen + 1 und - 1 liegen.

Bei der Gegenüberstellung von Trasylol zu Heparin errechneten wir einen Signifikanzwert von $T = 0,00921$. Trasylol zur Vergleichsgruppe $T = -3,64839$. Heparin zur Vergleichsgruppe $T = -3,56709$. Daraus ergibt sich keine signifikante Ergebnisdifferenz zwischen Trasylol und Heparin. Hochsignifikante Unterschiede zeigen beide Gruppen zu der nur mit Ringerlösung behandelten Vergleichsgruppe.

I. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

1) Liquemin

1000 USP/kg s.c. 90min vor der Verbrühung

2) Trasylol

100000 KIE/kg i.p.

3) Kontrollgruppe

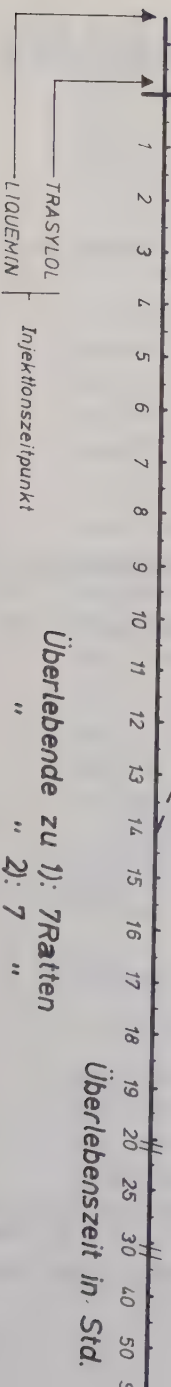
n=20

n=20

n=20

Überlebensrate in %

100 % ± 20 Ratten

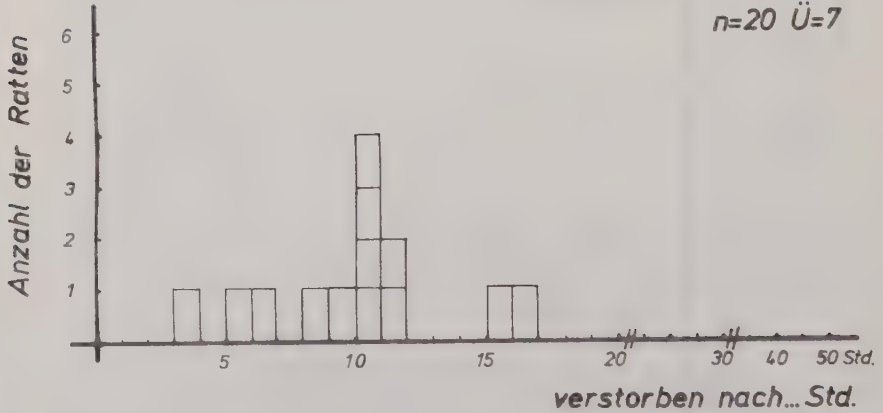


I. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

1) Liqueimin

1000 USP/Kg s.c

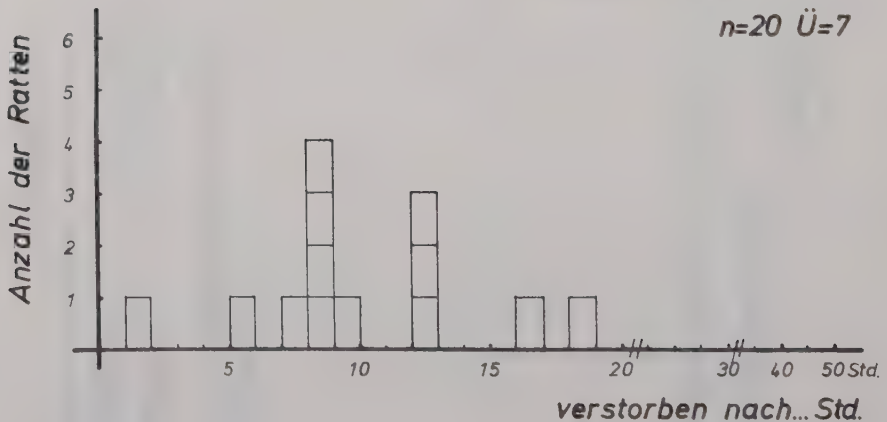
$n=20$ $\bar{U}=7$



2) Trasylol

100.000 KIE/Kg i.p

$n=20$ $\bar{U}=7$



4. II. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

Heparin und Trasylol / Heparin

Im zweiten Versuch wählten wir als Schocktherapeutikum die Kombination von Trasylol mit Heparin.

Anhand der Überlebenszeit wollten wir feststellen, ob sich die spezifischen Wirkungen von Trasylol und Heparin addieren.

Heparin vermindert, wie vor schon beschrieben, die Hyperkoagulabilität und Trasylol hemmt die überschießende Kininliberierung und vermindert so eine pathologische Hyperfibrinolyse.

Die Wirkungen von Trasylol und Heparin müssen trotz unterschiedlicher Angriffspunkte im Zusammenhang gesehen werden. Auch sollte man beim Vergleich dieser beiden Pharmaka nicht nur die Wirkungen auf den Gerinnungsablauf sehen, sondern auch neue erkannte Wirkungen in einem anderen funktionellen Bereich mit diskutieren.

Als direkte Vergleichsgruppe in diesem Versuch diente uns eine nur mit Heparin behandelte Tiergruppe. Wir konnten so die Vorteile einer Kombination Trasylol/Heparin im Vergleich zu Heparin direkt an den Kurvenverläufen ablesen.

Zusätzlich wollten wir das Ergebnis der Heparin-Gruppe aus dem I. Verbrühungsschockversuch verifizieren.

4.1. Methodik

Anzahl der Versuchstiere	: 40 jungfräuliche Sprag-Dawl. Ratten
Heparin/Trasylol-Gruppe	: 20 Ratten
Heparin-Gruppe	: 20 Ratten
Gewicht der Tiere	: 200 ± 5 gr
Verbrühungsdauer	: 30 sec
Verbrühungstemperatur	: 93° C

Wir applizierten allen 40 Ratten subcutan 750 USP/kg Heparin. Diese Applikationsmenge erhielten die Tiere zum gleichen Zeitpunkt mit dem Narkotika: 90 Minuten vor ihrer Verbrühung.

Wie im I. Versuch bereits angeführt, kann die intraperitoneale Injektion einer heparinisierten Ratte zu schweren Blutungen führen.

Daher injizierten wir jeweils 10 Minuten vor der Verbrühung 100.000 KIE/kg Trasylol in die Schwanzvene von 20 heparinisierten Tieren.

4.2. Resultate

Nach 50 Stunden lebten (sh. Diagramme S. 76 u. 77) von der Kombinationsgruppe Trasylol + Heparin noch 10 Ratten gegenüber 7 Ratten der Heparin-Gruppe. Gegenüber einer zu einem anderen Zeitpunkt ermittelten Kontrollgruppe läßt sich eine größere Überlebensrate beider Gruppen ablesen.

Den Kontrolltieren war nur Kochsalzlösung verabreicht worden (sh. Versuch V) und bereits nach 14 Stunden waren sämtliche Ratten gestorben (= 100 % Mortalität). Die Mortalität im Vergleich zu der Kontrollgruppe konnte mit der Kombinationsgruppe Trasylol + Heparin auf 50 %, die der Heparin-Gruppe auf 65 % gesenkt werden (sh. Diagramme S. 76 u. 77).

Sieht man sich 5 Stunden nach der Verbrühung die Anzahl der verendeten Ratten an, so sind bei der mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe bereits 9 Tiere verendet.

Bei der Heparin-Gruppe ist bis zu diesem Zeitpunkt eine Ratte und bei der Kombinationsgruppe Heparin + Trasylol noch keine Ratte gestorben.

In dem Zeitraum von der 5. bis zur 10. Stunde starben

in der Heparin/Trasylol-Gruppe 2 Tiere, während in der Heparin-Gruppe 6 Ratten starben.

Diese hohe Sterberate der Heparin-Gruppe in der 5. bis 10. Stunde nach dem Trauma korreliert mit der Sterberate in der Kontrollgruppe: in dieser starben 7 Tiere.

Das Resultat bestätigt die Tatsache, daß bereits in den ersten Stunden nach der Verbrühung die entscheidenden pathophysiologischen Mechanismen ablaufen.

Hier zeigt sich jetzt auch die sinnvolle Kombination von Heparin und Trasylol. In dieser Gruppe sind bis zur 15. Stunde erst 5 Tiere verendet, während die zum Vergleich herangezogene Heparin-Gruppe bereits 11 Tiere verloren hat.

4.3. Statistik

Die statistische Auswertung des Versuches zeigt eine Signifikanz beim Vergleich von Trasylol/Heparin zum Heparin von $T = -1,8613$. Ebenso bei der Gegenüberstellung beider Gruppen zur Kontrollgruppe. Trasylol/Heparin zur Kontrollgruppe $T = -4,69832$. Heparin im Vergleich zur Kontrollgruppe $T = -3,40447$. Das Ergebnis zeigt, daß in diesem Versuch mit der Kombination Trasylol und Heparin eine signifikante höhere Überlebensrate erreicht wurde, als unter alleiniger Heparintherapie.

II. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

1) Liquemin

750 USP/1kg s.c. 90min vor der Verbrühung

Trasylol

100000 KIE/kg i.v.

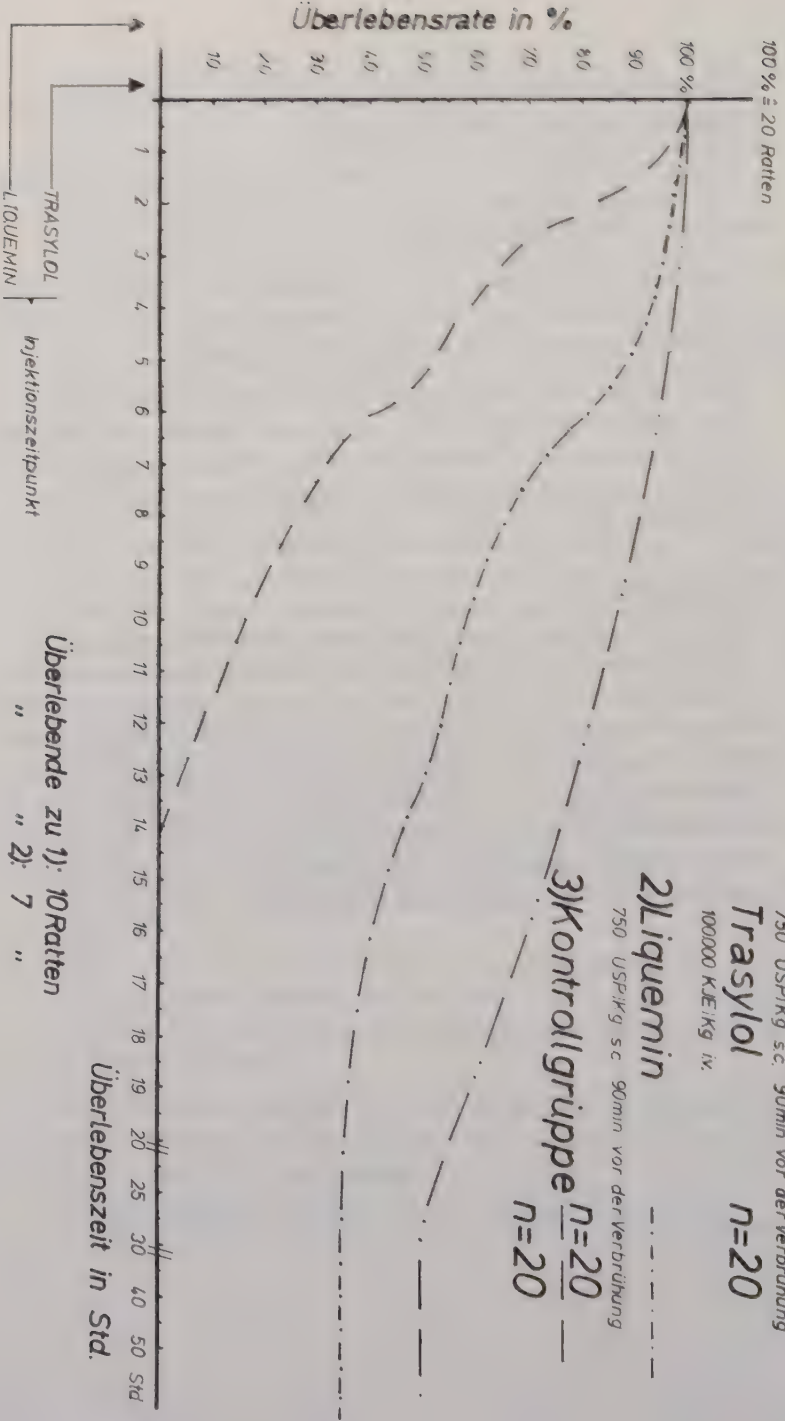
n=20

2) Liquemin

750 USP/1kg s.c. 90min vor der Verbrühung

3) Kontrollgruppe

n=20
n=20



Überlebende zu 1): 10 Ratten

" " 2): 7 "

" " 3): 0 "

II. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

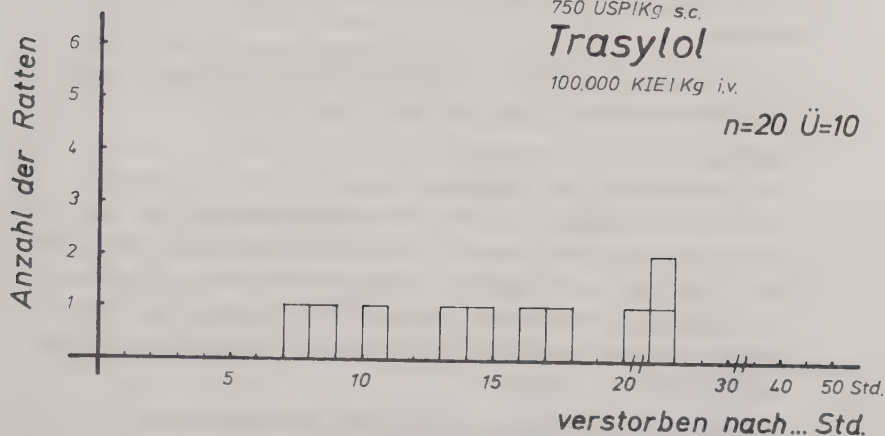
1) Liquemin

750 USPIKg s.c.

Trasyolol

100.000 KIEl Kg i.v.

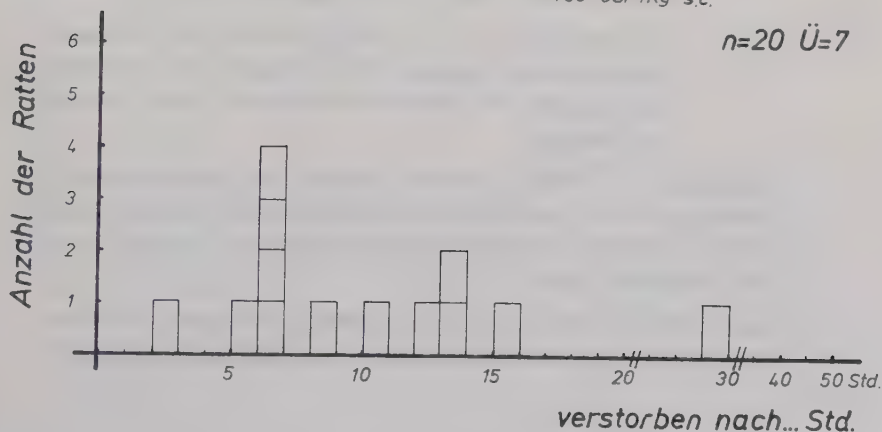
$n=20$ $\bar{U}=10$



2) Liquemin

750 USPIKg s.c.

$n=20$ $\bar{U}=7$



5. ZUSAMMENFASSUNG DER HEPARIN-VERSUCHE

Um einen besseren optischen Vergleich vornehmen zu können, sind auf dem Diagramm S. 80 nochmals die wichtigsten Heparin- und zugehörigen Trasylolkurven gegenübergestellt.

Erklärungen zum Verlauf finden sich in den Beschreibungen der Resultate aus den Versuchen I und II.

Nochmals kurz zusammengefaßt:

Die Medikation von Heparin, Trasylol oder von beiden kombiniert, erhöht sowohl die Überlebenszeit als auch die Überlebensrate von hitzetraumatisierten Ratten. Die mit Trasylol therapierten Tiere weisen ebenso wie die mit Heparin behandelten Ratten 7 Überlebende auf. In der Gruppe mit kombinierter Trasylol- und Heparintherapie überleben 10 Tiere.

Die Ergebnisse dieser Heparin-Serien bestätigen die schon in der Theorie gestellten Erwartungen:

1. Von den mit Heparin behandelten Versuchstieren überleben mehr als in der unbehandelten Vergleichsgruppe.
2. Die Überlebensrate der Heparin-Gruppe entspricht der nur mit Trasylol therapierten Gruppe.
3. Die kombiniert mit Trasylol und Heparin behandelten Ratten weisen die geringste Mortalitätsrate auf im Vergleich zur Heparin- bzw. Trasylol-Gruppe.

Besonders die letzte Aussage scheint uns bedeutungsvoll. Können wir doch annehmen, daß bei der Kombination von Trasylol/Heparin höchstwahrscheinlich ein additiver Effekt zugrunde liegt.

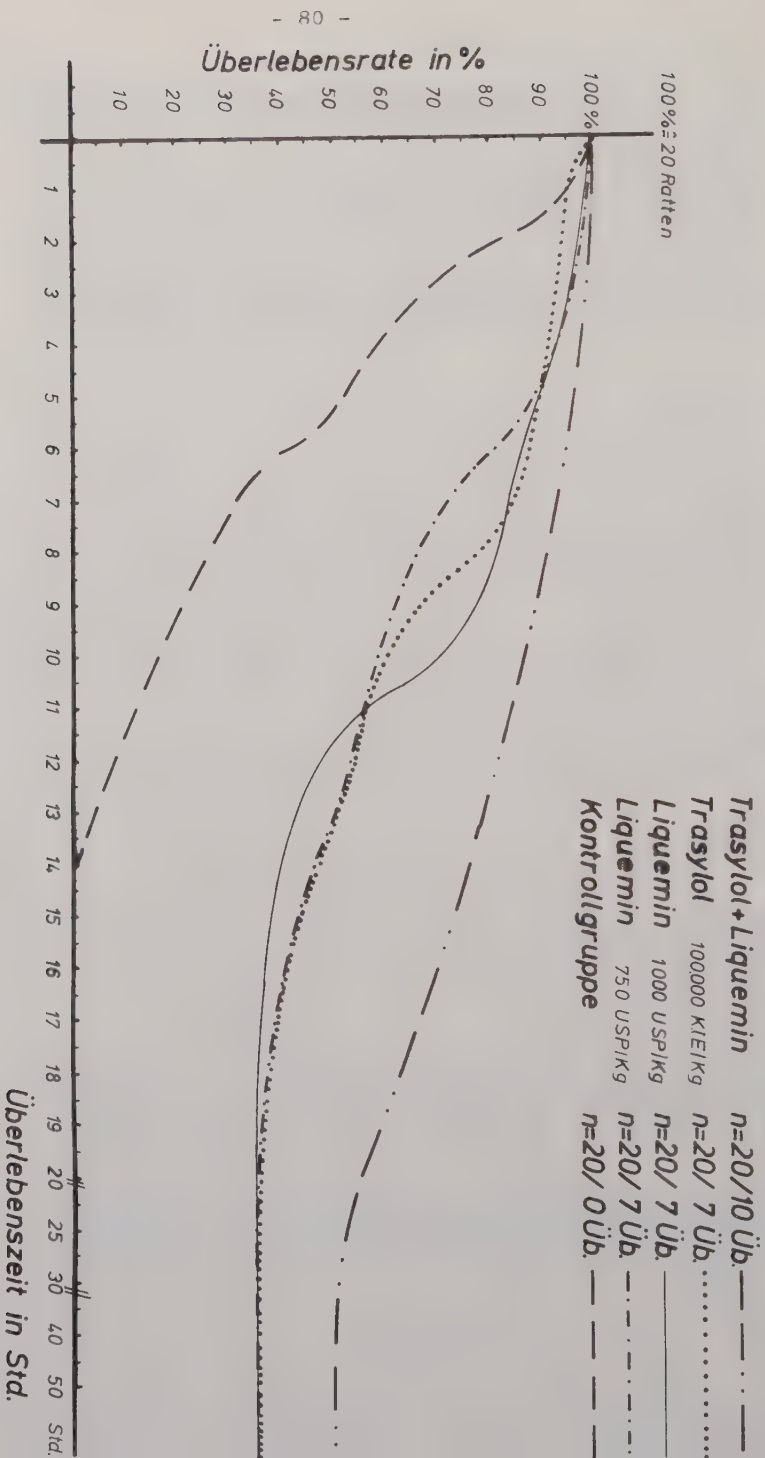
Auch POPOV konnte mit einer Kombinationstherapie Trasylol/Heparin die Mortalitätsrate von Patienten, die ei-

nen traumatisch-haemorrhagischen Schock erlitten hatten, hochsignifikant senken (154).

Nach diesem Ergebnis verzichteten wir auf weitere Serien mit Heparin behandelten Tieren.

Wir betrachteten diese ersten beiden Serien als ausreichende Vergleichsmöglichkeit zu noch folgenden Testen mit neuartigen Proteinaseninhibitoren.

ZUSAMMENSTELLUNG DER VERSUCHE I+II



6. III. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

Seeanemoneninhibitor / Trasylol

Umfangreiche Vorversuche waren erforderlich, um den neuartigen Proteinaseninhibitor aus Seeanemonen erstmals im Vergleich zu Trasylol zu testen.

Wir untersuchten zunächst, ob der von uns gereinigte Inhibitor noch mit Toxinen behaftet war. Von dem Kieler Meeresbiologen L. BÉRESS wissen wir, daß Krabben besonders empfindlich auf solche Toxine reagieren; injiziert man ihnen einen Seeanemoneninhibitor, der auch nur in Spuren Toxine enthält, so verenden die Krabben nach kürzester Zeit.

Für diesen sehr spezifischen Test auf Toxine, stellte und L. BÉRESS freundlicherweise Krabben zur Verfügung. Wir injizierten den Krabben relativ große Mengen des Inhibitors. Auch nach längerer Beobachtung zeigten die Tiere keine ausgeprägte Wirkung, es fiel lediglich eine Verlangsamung ihrer Bewegungen auf.

Um die Verträglichkeit des Inhibitors bei Ratten abzuklären, injizierten wir einigen Ratten den Inhibitor, allerdings ohne anschließende Verbrüfung der Tiere. Bei keinem Tier war eine Wirkung nachweisbar. Als wir im letzten Vortest untersuchten, wie Ratten nach einer Verbrüfung die vorherige Gabe des Inhibitors tolerieren, mußten wir feststellen, daß sämtliche Ratten verbluteten.

Der normal gereinigte Inhibitor war demnach noch mit toxischem Material behaftet, das die Krabben und nicht verbrühten Ratten tolerierten, das aber in Kombination mit einer Verbrüfung zu letalen Blutungen bei den Ratten führte. Wahrscheinlich handelt es sich bei den Toxinen um Kapillargifte.

Die histologische Untersuchung von Lunge, Niere und Le-

ber dieser Tiere zeigte bei allen drei Organen eine verstärkte Hyperämie im Vergleich zu den Organen ohne Therapie verbrühter Ratten. Die Histologie von Leber und Lunge zeigte außerdem eine massive Thrombenbildung.

Als Hinweis auf ein als Kapillargift wirkendes Toxin dienten auch noch folgende Veränderungen in der Lunge: Vermehrte Blutungen, außergewöhnlich zahlreiche Endothelnekrosen und sehr ausgeprägte Gefäßwandödeme.

Nach dem negativ verlaufenen Vortest mit dem normal gereinigten Inhibitor, überließ uns freundlicherweise WUNDERER einen von ihm selbst isolierten und hochgereinigten Isoinhibitor aus Seeanemone.

Nachdem wir erneut mit dem Krabbentest und auch in Versuchen an unverbrühten und verbrühten Ratten eine Toxizität dieses mit Ionenaustauschern hochgereinigten Isoinhibitors ausgeschlossen hatten, ermittelten wir noch an Hand von Rattenversuchen eine wirksame Dosis für unsere Verbrühungsschockversuche.

Wir fanden schließlich, daß die Ratten, denen umgerechnet 40.000 KIE/kg = 22.222 T.I.m.E. Seeanemoneninhibitor injiziert worden war, eine gute Vergleichsmöglichkeit zu mit Trasylol behandelten Tieren abgaben.

6.1. Methodik

Anzahl der Versuchstiere	: 40 Sprag-Dawl. Ratten
Trasylol-Gruppe	: 20 Ratten
Seeanemonen-Gruppe	: 20 Ratten
Gewicht der Tiere	: 200 ± 5 gr
Verbrühungsdauer	: 30 sec
Verbrühungstemperatur	: 93° C

Sämtliche Tiere wurden 45 Minuten vor ihrer jeweiligen Verbrühung narkotisiert.

Den Ratten der einen Gruppe injizierten wir intraperi-

toneal 10 Minuten vor ihrer Verbrühung 40.000 IE/kg Seeanemoneninhibitor. Die 20 Tiere der anderen Gruppe erhielten ebenfalls intraperitoneal 10 Minuten vor ihrer Verbrühung 40.000 KIE/kg Trasylol. Wie schon in der Versuchsbeschreibung erwähnt, wurden die Tiere alternierend therapiert und verbrüht.

Wir wählten diesmal eine Trasylol-Dosis von 40.000 KIE/kg, weil sie ein gutes Äquivalent zu der ermittelten Seeanemoneninhibitor-Dosis von 40.000 IE/kg darstellt.

6.2. Resultate

In dem Beobachtungszeitraum bis zur 5. Stunde nach Traumasetzung ist lediglich in der Trasylol-Gruppe ein Tier verstorben. In der Kontrollgruppe sind im gleichen Zeitraum bereits 9 Tiere verendet. Ein Erfolg beider Inhibitoren, sowohl des Trasylol als auch des Seeanemoneninhibitors, ist bis zur 5. Stunde nach Trauma somit deutlich sichtbar.

Im nächsten Zeitabschnitt von der 5. - 10. Stunde nach der Verbrühung starb in der Seeanemonen-Gruppe lediglich ein Tier, im Gegensatz zur Trasylol-Gruppe in der 4 Tiere verendeten.

Im folgenden Intervall von der 10. bis zur 15. Stunde nach Traumasetzung, den keine Ratte der unbehandelten Kontrollserie überlebte, ist die Anzahl von 3 verstorbenen Ratten in der Seeanemoneninhibitor-Gruppe wiederum sehr gering, auch im Vergleich zur Trasylol-Gruppe in der 5 Tiere verendeten.

Insgesamt hat die Trasylol-Gruppe in dem entscheidenden Zeitraum bis zur 15. Stunde bereits 10 Tiere verloren gegenüber erst 4 Tieren der Seeanemoneninhibitor-Gruppe.

Im weiteren Verlauf der Beobachtung starben in der Seeanemoneninhibitor-Gruppe nochmals 4 Tiere, jedoch in so

großen Zeitabständen, daß es auf dem Diagramm S. 85 zu einem stetigen Kurvenverlauf kommt.

In der Trasylol-Gruppe starben noch 5 Tiere. Da 3 Tiere erst um die 40. Stunde nach der Verbrührung verendeten, kommt es zu diesem Zeitpunkt nochmals zu einem deutlichen Abfall im Kurvenverlauf (Diagramm S. 85). Die Stetigkeit der Seeanemoneninhibitor-Gruppe wird damit nicht erreicht.

Die Mortalität der Trasylol-Gruppe dieser Serie ist nun auch insgesamt und eigentlich erwartungsgemäß um 10 % größer als die der Trasylol-Gruppe aus der II. Serie, in der die Tiere mit einer bekanntlich größeren Dosis therapiert wurden (sh. Diagramm Mortalität).

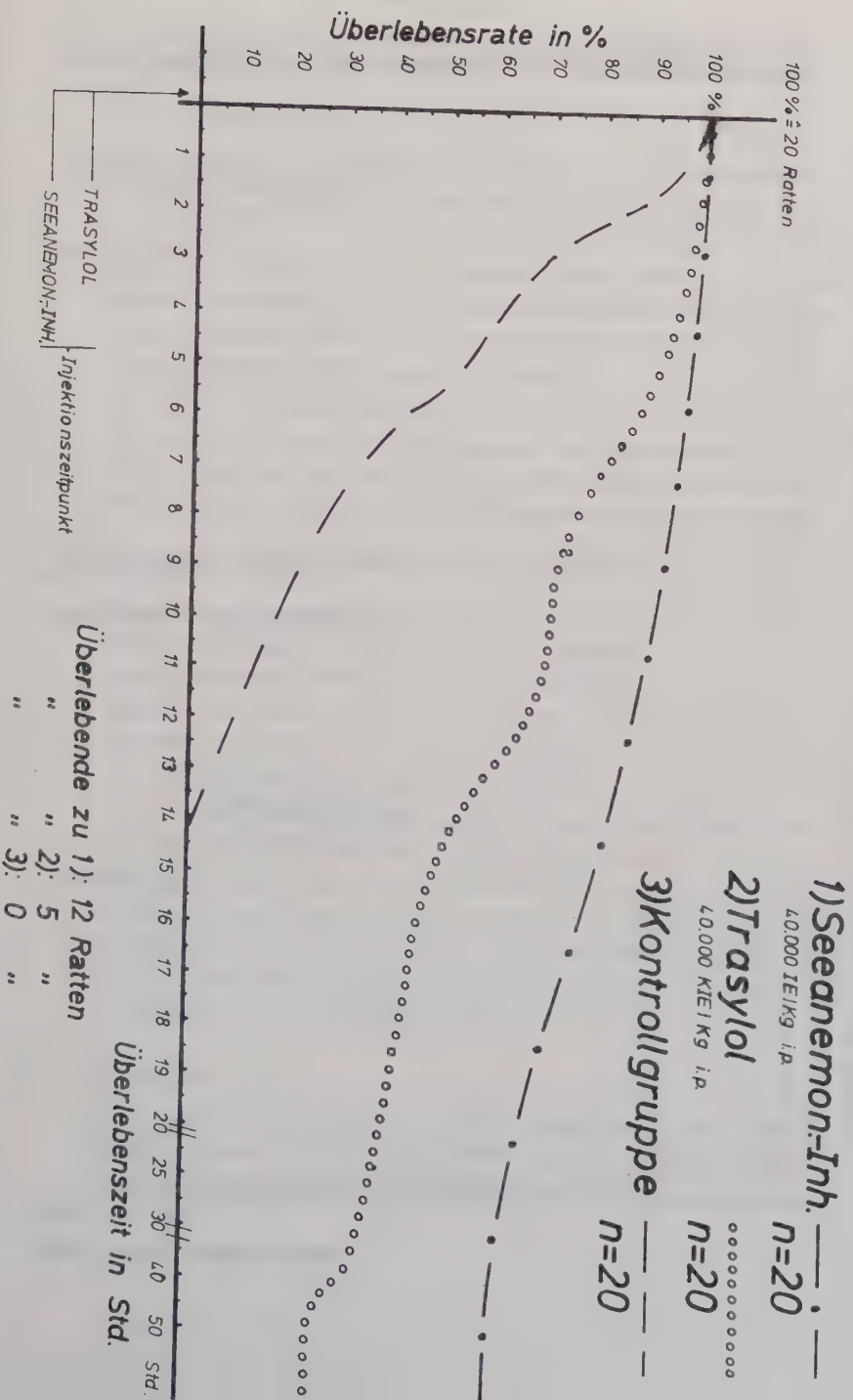
Die Mortalität der Seeanemoneninhibitor-Gruppe ist um 35 % geringer als die Mortalität der zum Vergleich anstehenden Trasylol-Gruppe dieser Serie. Dieses zeigt sich auch deutlich bei der Betrachtung der beiden Kurvenverläufe (Diagramm S. 85).

6.3. Statistik

Nach dem WILCOXEN-MANN-WHITNEY-Signifikanztest konnten wir bei dem Vergleich von Trasylol mit dem Seeanemoneninhibitor eine Signifikanz auf dem 2 % Niveau erreichen, mit einem Testergebnis von $T = -2,25249$.

Das Testergebnis von Trasylol zur Kontrollgruppe beträgt $T = -3,90993$; von Seeanemoneninhibitor zur Kontrollgruppe $T = -4,7142$. Diese letzten beiden Ergebnisse liegen somit unter dem 1 % Niveau.

III. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

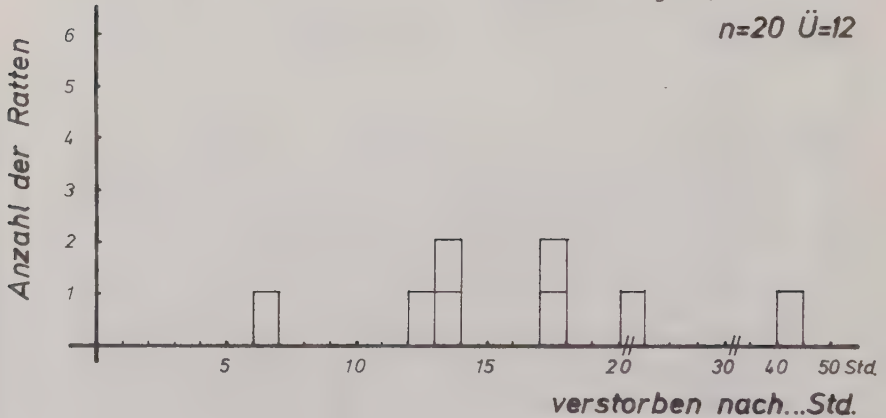


III. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

1) Seeanemon-Inh.

40.000 IE/Kg i.p.

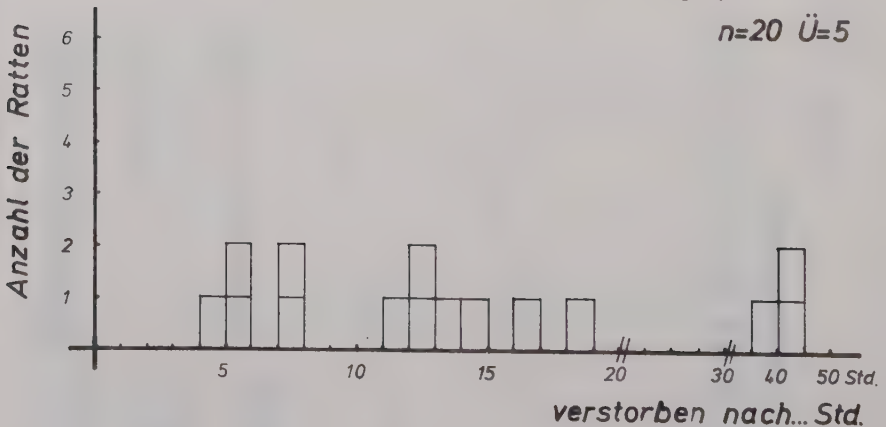
$n=20$ $\bar{U}=12$



2) Trasylol

40.000 KIE/Kg i.p.

$n=20$ $\bar{U}=5$



7. IV. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

Seeanemoneninhibitor / Trasylol

Der vorherige dritte Versuch brachte ein überraschend gutes Ergebnis des Seeanemoneninhibitors im Vergleich zu Trasylol.

Um Eventualitäten (Witterungseinflüsse, Fehler von Seiten der Substanz) und systematische Fehler im III. Versuch auszuschließen, führten wir diesen IV. Versuch - einen Wiederholungsversuch - durch.

Bei der IV. Versuchsserie achteten wir peinlich genau auf die Einhaltung der Kriterien aus dem vorherigen Versuch. Denn die so erhaltenen Werte sollten einen guten Vergleich mit dem der ersten Versuchsserie ermöglichen.

7.1. Methodik

Anzahl der Versuchstiere	: 40 Sprag-Dawl. Ratten
Trasylol-Gruppe	: 20 Ratten
Seeanemoneninhibitor-Gruppe	: 20 Ratten
Gewicht der Tiere	: 200 ± 5 gr
Verbrühungsdauer	: 30 sec
Verbrühungstemperatur	: 93° C

Alle Tiere wurden 45 Minuten vor ihrer jeweiligen Verbrühung mit 2 ml. Chloralhydrat narkotisiert; wie in der vorherigen III. Serie wurde eine Gruppe mit 40.000 KIE/kg Trasylol, die andere mit 40.000 IE/kg Seeanemoneninhibitor therapiert. Die intraperitoneale Applikation der Inhibitoren erfolgte auch hier wieder 10 Minuten vor der Verbrühung.

7.2. Resultate

Auf dem Diagramm dieses Versuchs sieht man erneut bei beiden Gruppen bis zur 5. Stunde nach dem Trauma nur eine geringe Anzahl verstorbenen Ratten:

In der Seeanemoneninhibitor-Gruppe eine Ratte,
in der Trasylol-Gruppe zwei Ratten.

Es zeigt sich auf dem Diagramm S. 90 bis zur 5. Stunde
ein nahezu identischer Kurvenverlauf.

Im weiteren Beobachtungszeitraum von der 5. - 10. Stunde weichen die beiden Kurven erheblich voneinander ab. In dieser Zeit starben in der Seeanemoneninhibitor-Gruppe zwei Tiere, während in der mit Trasylol therapierten Gruppe bereits 5 Tiere verendeten. Beide Gruppen zeigten jedoch eine eindeutig bessere Überlebensrate im Vergleich zu den Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe.

Auch im Intervall von der 10. - 15. Stunde nach dem Trauma, in der die restlichen Tiere der Kontrollserie verendeten, ändert sich die Überlebensrate der Seeanemoneninhibitor-Gruppe nur unwesentlich. In dieser Gruppe starben nur drei Tiere, während in der Trasylol-Gruppe, wie schon im vorherigen Zeitintervall von der 5. - 10. Stunde, wieder 5 Ratten verendeten.

Diese Tendenz ändert sich auch im weiteren Versuchsablauf nicht.

In der Trasylol-Gruppe verendeten nach der 15. Stunde nochmals 9 Tiere. Eine unerwartet große Zahl im Vergleich zu nur 3 Tieren der Seeanemoneninhibitor-Gruppe und auch eine hohe Zahl im Vergleich zu 5 Tieren der Trasylol-Gruppe der III. Serie.

Das Abweichen in der Überlebensrate der Seeanemoneninhibitor-Gruppe zur Trasylol-Gruppe wird auch auf dem Diagramm S. 90 recht deutlich. Hier kann der Seeanemoneninhibitor immerhin eine um 50 % geringere Mortalität aufweisen.

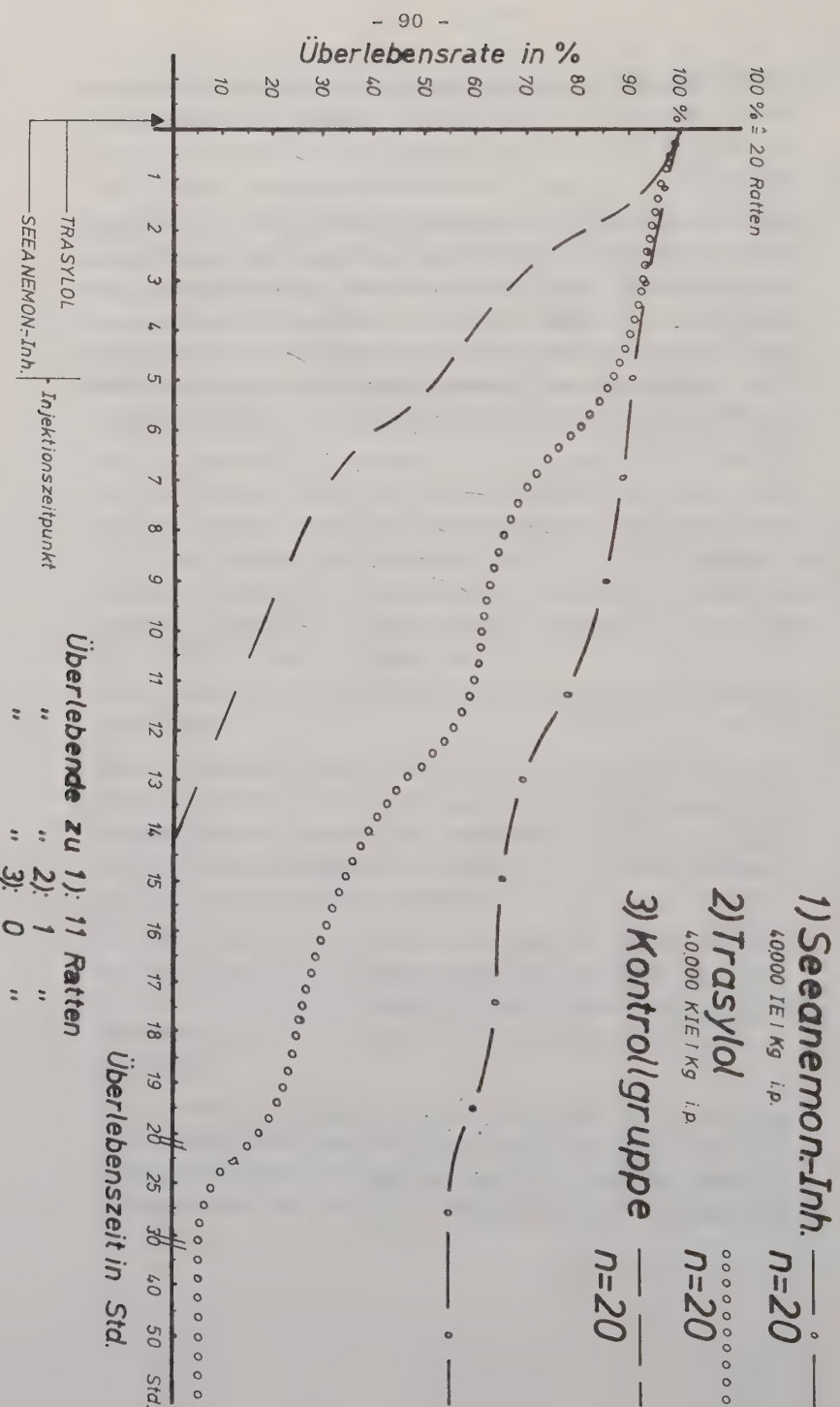
Im wesentlichen konnte das Ergebnis der III. Versuchsserie verifiziert werden. Die Überlebensraten der Seeanemoneninhibitor-Gruppe aus der III. und IV. Serie entsprechen sich mit 60 % zu 55 % recht gut. Lediglich die

Mortalität der Trasylol-Gruppe aus diesen beiden Serien weicht mit 75 % zu 95 % relativ gering voneinander ab.

7.3. Statistik

Bei der Gegenüberstellung der Trasylol- und Seeanemoneninhibitor-Gruppen ergibt der WILCOXEN-MANN-WHITNEY-Test eine deutliche Signifikanz auf dem 2 % Niveau mit einem zugehörigen Testwert von $T = -2,2759$. Das Testergebnis von Trasylol zur Kontrollgruppe beträgt $T = -3,3001$ und die Signifikanz des Seeanemoneninhibitors zur Kontrollgruppe liegt mit einem Testwert von $T = -4,01224$ unter dem 1 % Niveau.

IV. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

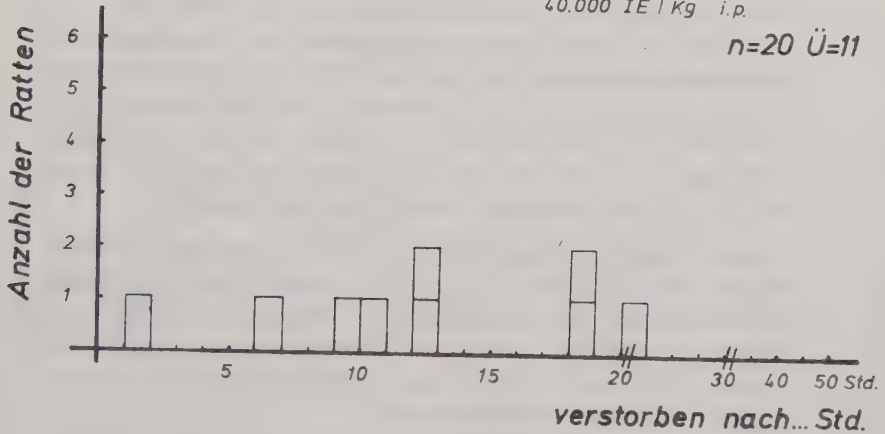


IV. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

1) Seeanemon-Inh.

40.000 IE / Kg i.p.

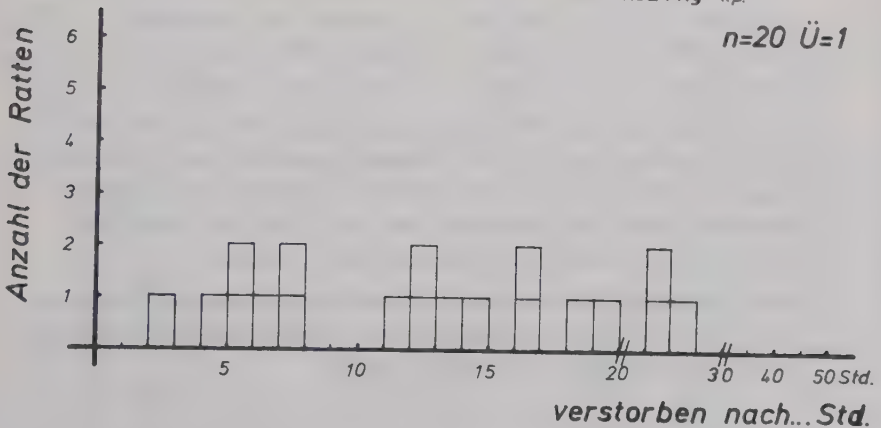
$n=20$ $\bar{U}=11$



2) Trasyolol

40.000 KIE / Kg i.p.

$n=20$ $\bar{U}=1$



8. ZUSAMMENSTELLUNG DER SEEANEMONENINHIBITOR-VERSUCHE

Der Anschaulichkeit wegen wurden die beiden Seeanemonen-inhibitor-Gruppen und die Kontrollgruppe der V. Versuchsserie gegenübergestellt (sh. Diagramm S. 93).

Beim Vergleich der Seeanemoneninhibitor-Kurven fällt auf, daß sie kurz nach dem Zeitpunkt der Traumasetzung auseinanderweichen, um dann aber bis zur 10. Stunde parallel zu verlaufen. Das bedeutet, die Überlebensrate unterscheidet sich um nur 5 %, doch ist die Überlebenszeit der Seeanemoneninhibitor-Gruppe aus der III. Serie bis zu diesem Zeitpunkt bereits gering verkürzt.

Dagegen zeigt die Kurve der nur mit Ringerlösung behandelten Kontrolltiere bis zur 10. Stunde eine ausgeprägte Verkürzung der Überlebenszeit. Während in der Kontrollgruppe bis zur 10. Stunde 16 Tiere verenden, stirbt in dieser Zeit nur ein Tier aus der Seeanemoneninhibitor-Gruppe der III. Versuchsserie.

Über die 10. Stunde nach der Verbrührung hinaus laufen die beiden Seeanemoneninhibitor-Kurven zunächst nicht parallel. Während die Kurve aus der III. Serie stetig weiter verläuft, fällt die Kurve aus der IV. Serie steiler ab.

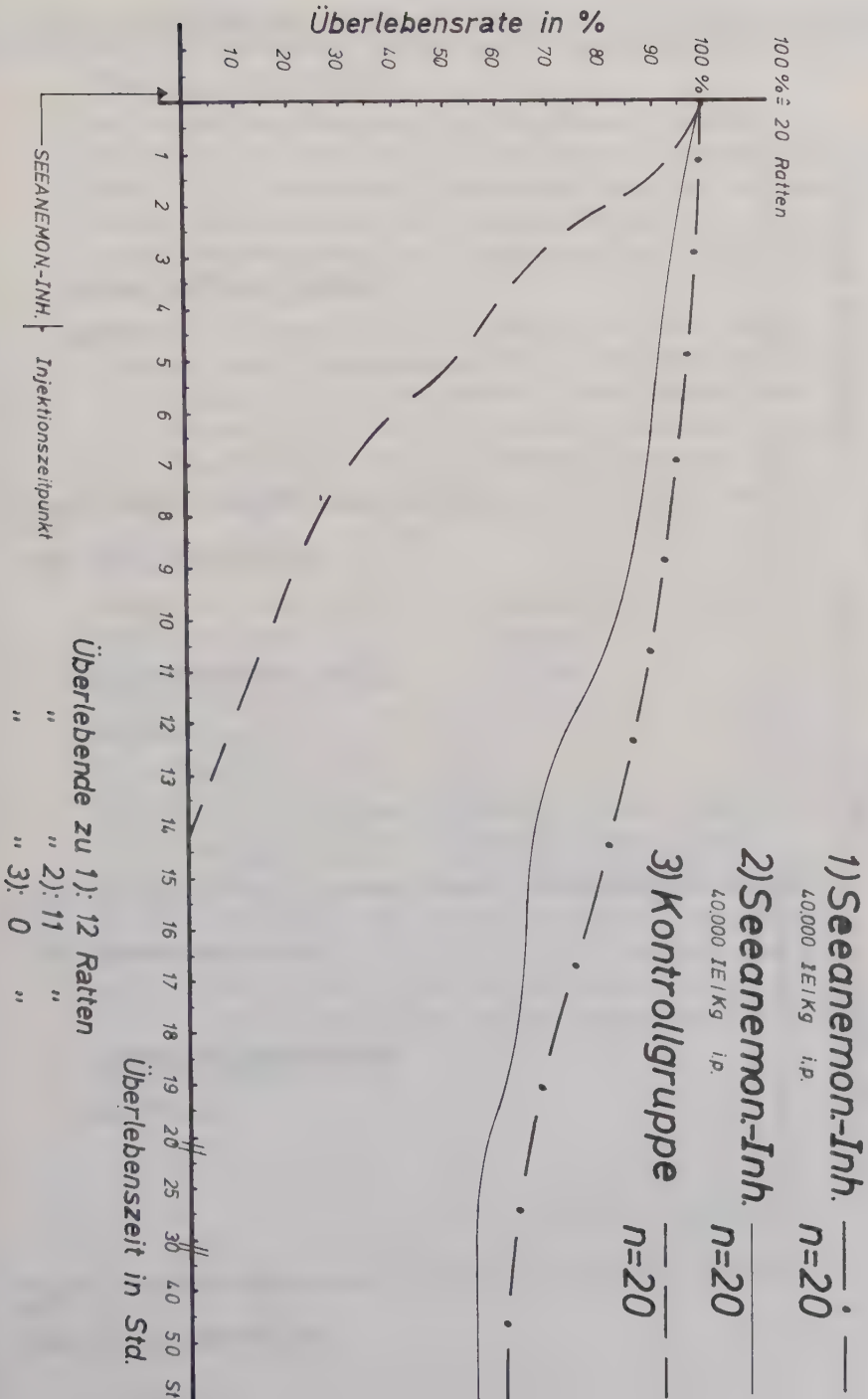
Dies ist bedingt durch eine erhöhte Sterbequote im Zeitraum von der 10. bis zur 13. Stunde (sh. Diagramm S. 93). Ab der 20. Stunde nach dem Trauma nähern sich die Kurven einander wieder und verlaufen erneut parallel.

Da die Kurven der Seeanemoneninhibitor-Gruppe bis zur 10. Stunde und ab der 20. Stunde deutlich parallel verlaufen, und der Unterschied in der Mortalität nur 5 % beträgt, kann das Ergebnis der III. und IV. Serie für die weitere Diskussion als gesichert gelten.

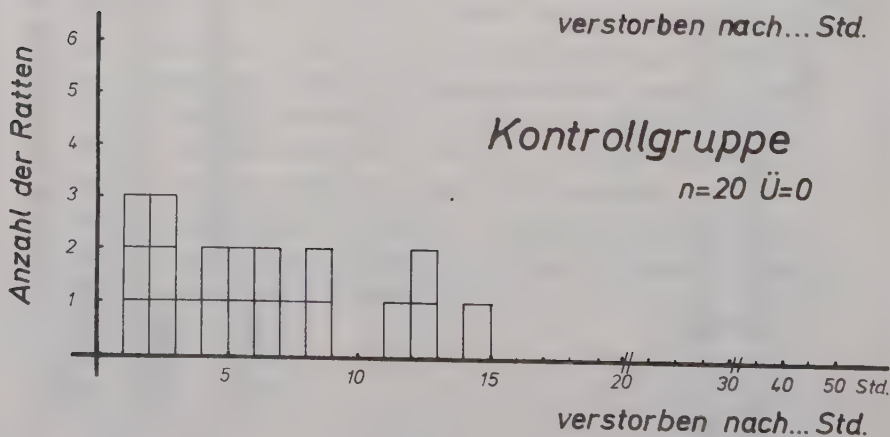
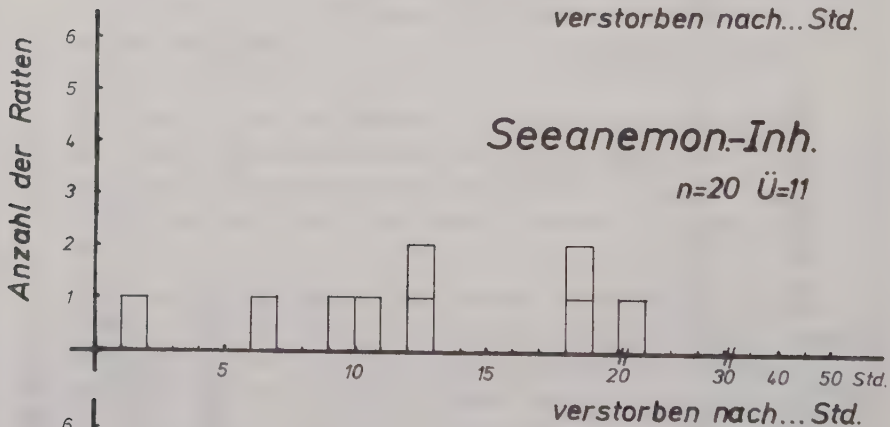
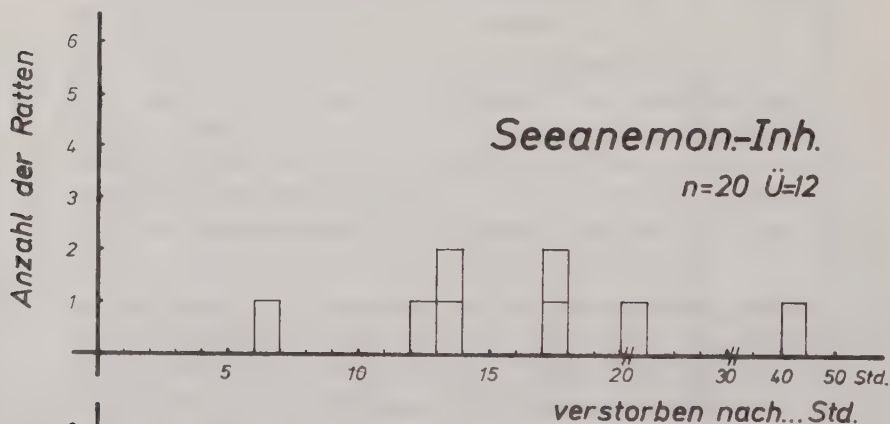
Der Inhibitor dürfte sich für weitere Versuche anbieten, da die Signifikanz gegenüber der Kontrollserie in beiden Serien unter dem 1 % Niveau liegt.

ZUSAMMENSTELLUNG AUS VERSUCH III+IV.

- 93 -



ZUSAMMENSTELLUNG AUS VERSUCH III+IV.



9. V. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH

Trasylol / Ringerlösung

Mit dieser Serie wollten wir zwei Dinge erreichen:
Erstens das Ergebnis der Trasylol-Gruppe (100.000 KIE/kg) aus der II. Versuchsserie bestätigen, zweitens mit einer Gruppe unbehandelter Tiere das Ergebnis der Kontrollgruppe der Arbeitsgemeinschaft LEWANDOWSKI (120) verifizieren.

Diese Arbeitsgemeinschaft hatte ein Jahr zuvor unter gleichen Versuchsbedingungen ähnliche Verbrühungsversuche durchgeführt. Sie ermittelten unter anderem auch das Ergebnis einer Kontrollgruppe mit unbehandelten Tieren (Chloralhydrat und Ringerlösung), an dem wir uns ebenfalls zunächst orientierten.

9.1. Methodik

Anzahl der Versuchstiere	: 40 Sprag-Dawl. Ratten
Trasylol-Gruppe	: 20 Ratten
Kontrollgruppe	: 20 Ratten
Gewicht der Tiere	: 200 ± 5 gr
Verbrühungsdauer	: 30 sec
Verbrühungstemperatur	: 93° C

Sämtliche Tiere wurden 45 Minuten vor ihrer jeweiligen Verbrühung mit 2 ml Chloralhydrat narkotisiert.

Den 20 Tieren der einen Gruppe injizierten wir 10 Minuten vor dem Trauma 100.000 KIE/kg Trasylol. Die Tiere der anderen Gruppe hatten bereits mit dem Narkotica die entsprechende Menge Ringerlösung injiziert bekommen, um einen reinen Volumeneffekt des Pharmakons auf die Überlebensrate ausschließen zu können.

9.2. Resultate

In den ersten 5 Stunden nach dem Trauma verendete in der Trasylolgruppe kein Tier. In der Kontrollgruppe hingegen starben in diesem ersten Intervall bis zur 5. Stunde bereits 9 Tiere. Das sind 45 % der Kontrollgruppe überhaupt. Gerade in diesem Zeitabschnitt laufen demnach schwerwiegende pathophysiologische Mechanismen ab, die zu einem schnellen Tod der Tiere führen.

Bis zur 5. Stunde bestätigt die Trasylolgruppe dieser Serie auch das Ergebnis der Trasylolgruppe aus der II. Serie.

Während im zweiten Zeitintervall, von der 5. bis zur 10. Stunde, in der Trasylolgruppe nur 3 Tiere sterben, verliert die Kontrollgruppe 7 Tiere. In diesem Zeitraum weichen auch die Überlebensraten der Trasylol-Gruppe dieser Serie von der Trasylol-Gruppe aus der II. Serie deutlich voneinander ab (Diagramm S. 100).

Im dritten Zeitintervall von der 10. bis 15. Stunde starben in der Kontrollgruppe die bis dahin noch verbliebenen 4 Tiere. In der Trasylol-Gruppe starben in diesem Zeitabschnitt nur 6 Tiere.

Im Vergleich zur Trasylol-Gruppe aus der III. Serie haben sich die Überlebensraten nahezu wieder ausgeglichen.

In der Trasylol-Gruppe der II. Serie starben die meisten Ratten im zweiten Zeitintervall von der 5. - 10. Stunde, während sie in dieser Serie innerhalb der 10. - 15. Stunde vermehrt starben. Insgesamt ist auch eine größere Steigung in der Kurve der Überlebensrate dieser Trasylolserie festzustellen (sh. Diagramm S. 98).

Bis zum Ende des Versuches starben in der Trasylolgruppe dieser Serie nochmals 5 Tiere. Damit sind in dieser Gruppe insgesamt 14 Tiere gestorben, das entspricht einer Mortalität von 70 %. Hiermit ist die Mortalität dieser Gruppe nur um 5 % größer als die der Trasylol-Gruppe

aus der Serie II, die es zu verifizieren galt.

Die unbehandelte Gruppe bestätigt das Ergebnis der Arbeitsgemeinschaft LEWANDOWSKI. Ihre aufgestellte Kurve der unbehandelten Kontrolltiere weist die größte Sterbequote zwischen der 4. und 7. Stunde nach Traumasetzung auf; die Kurve zeigt in diesem Zeitraum einen steileren Verlauf als die Kurve unserer unbehandelten Tiere, doch überlebt in beiden Gruppen kein Tier die 15. Stunde nach dem Setzen der thermischen Läsion (Diagramm S. 99).

Diese relativ gute Übereinstimmung beweist, daß sich mit dem gewählten Verbrühungsschockmodell untereinander vergleichbare Ergebnisse ermitteln lassen, auch wenn wie in unserem Fall, zwei verschiedene Arbeitsgruppen daran beteiligt sind.

Das Ergebnis dieser Kontrollgruppe haben wir nachträglich als Vergleichsmöglichkeit zu den vorausgegangenen Versuchen herangezogen und in die Kurvendiagramme eingezeichnet.

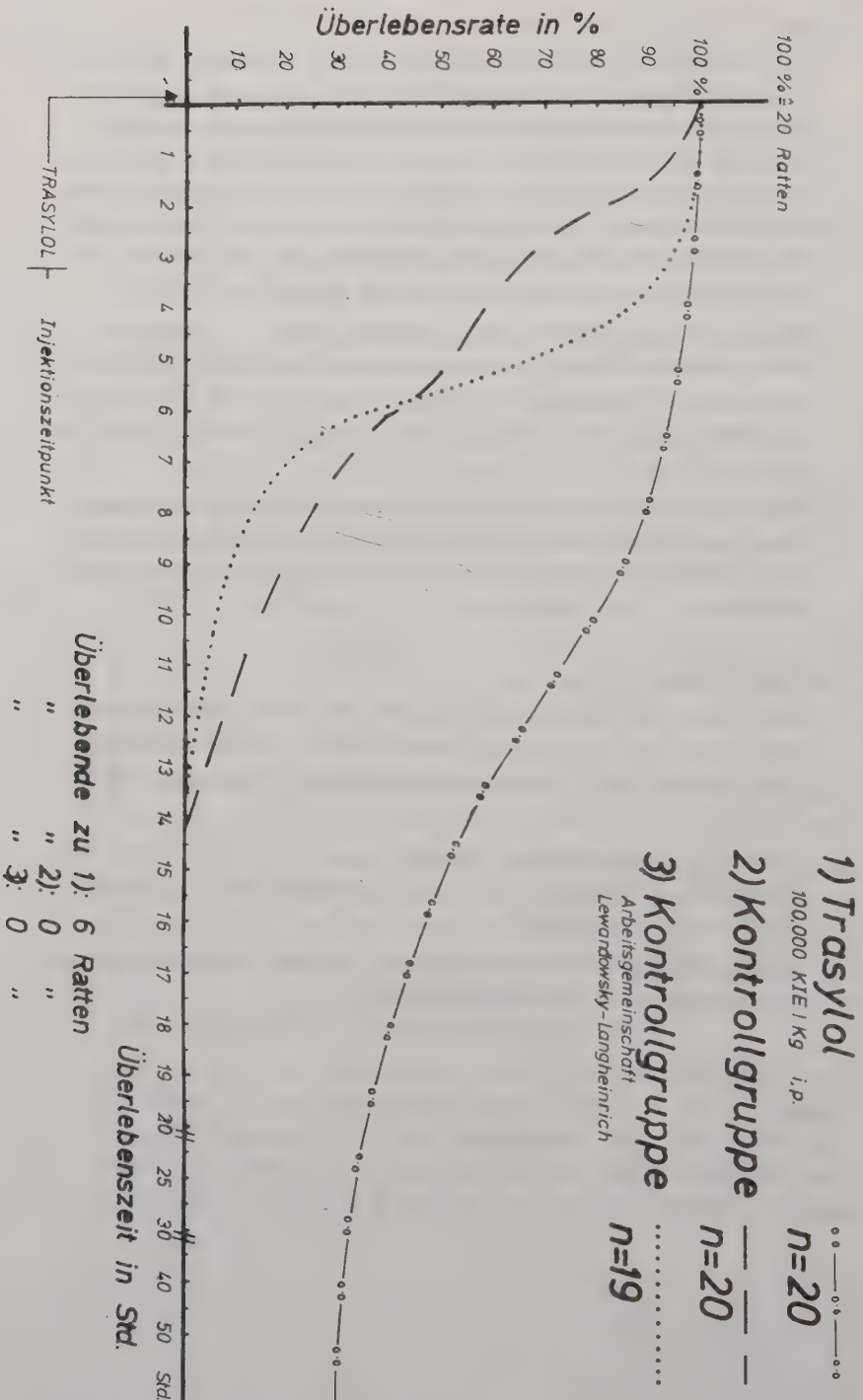
9.3. Statistik

Mit einem Signifikanzwert von $T = -4,4735$ zeigte sich auch nach der WILCOXEN-MANN-WHITNEY-Statistik der Therapieerfolg der Trasylol-Gruppe dieser Serie gegenüber der Kontrollgruppe.

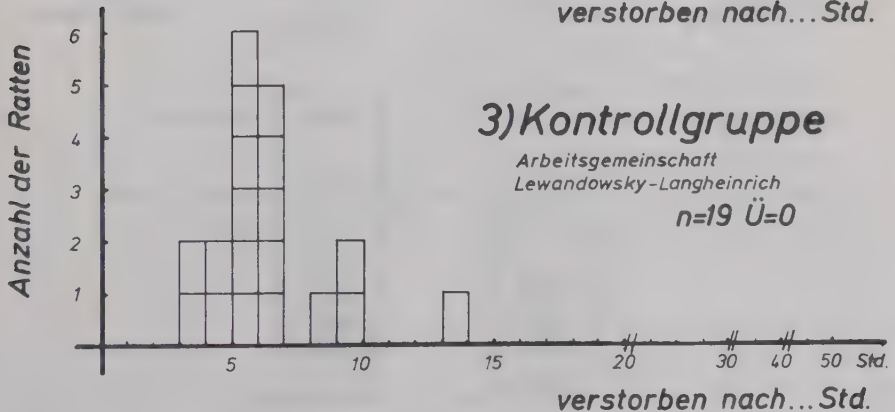
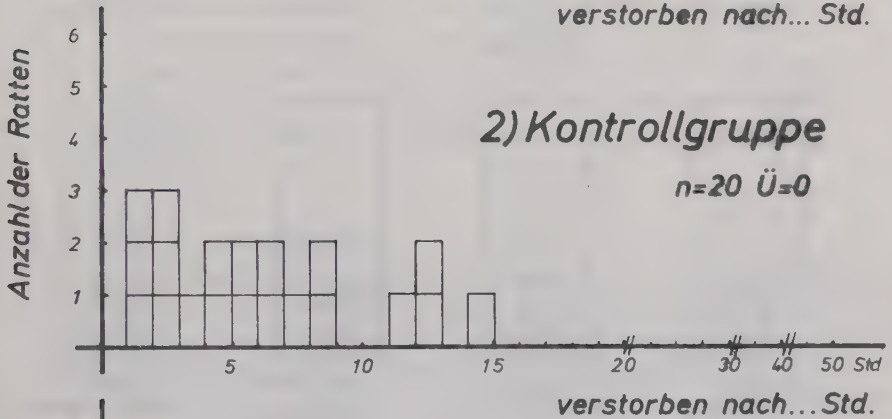
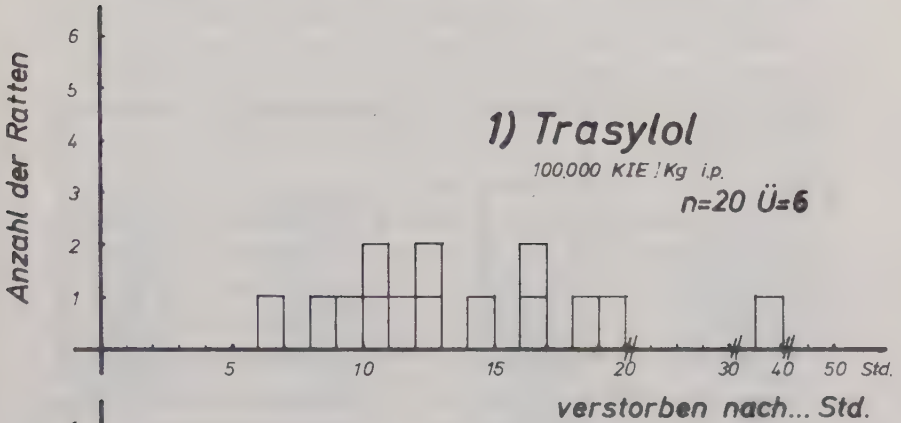
Unsere Kontrollgruppe erreicht mit $T = 0,6181$ keine signifikante Abweichung zur Kontrollgruppe der Arbeitsgemeinschaft LEWANDOWSKI.

Dieser Befund spricht ebenfalls für die gute Reproduzierbarkeit unseres Versuchsmodells.

V. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH



V. VERBRÜHUNGSSCHOCKVERSUCH



DIE MORTALITÄT IM VERGLEICH ZU DER KONTROLLGRUPPE $\hat{=}$ 100 %



Kontroll-
gruppe



Liquemin
750 USPIKg
Trasylol
100.000 KIEIKg



Liquemin
750 USPIKg



Liquemin
1000 USPIKg



Seeanemon-
Inhibitor
40.000 IEIKg



Trasylol
40.000 KIEIKg



Seeanemon-
Inhibitor
40.000 IEIKg



Trasylol
40.000 KIEIKg



Trasylol
100.000 KIEIKg



Trasylol
100.000 KIEIKg

10. HISTOLOGIE

Zur Ergänzung und Bestätigung der guten Versuchsergebnisse, die sich vor allem unter der Therapie von Seeanemoneninhibitor und Trasylol ergaben, entschlossen wir uns zu einer histologischen Untersuchung spezifischer Schockorgane. Es interessierten uns vor allem Veränderungen in Leber, Nieren und Lungen, der unter oben genannter Therapie verbrühten Ratten.

Bei der histologischen Auswertung hofften wir zu erfahren, ob signifikante pathohistologische Unterschiede entstehen unter einer Therapie mit Seeanemoneninhibitor bzw. mit Trasylol; ferner ob sich die Erhöhung der Überlebensrate durch diese beiden Inhibitoren auch durch geringere pathohistologische Veränderungen erklären läßt.

Die Einbettung, der Schnitt und die Färbung der Präparate wurde im Pathologischen Institut der Universität München vorgenommen. Für diese Arbeit danken wir herzlich Frau Calvör (Labor Prof. Schauer). Im gleichen Institut erfolgte die histologische Auswertung durch Herrn Dr. REMBERGER.

10.1. Material und Methode

Da die Verbrühungsversuche bereits abgeschlossen waren, mußten wir neue Tiergruppen zusammenstellen, um die Organe für die histologische Untersuchung zu erhalten. Wir bildeten Gruppen von jeweils 10 Ratten.

Kontrollgruppe	: keine Verbrühung u. keine Therapie
Vergleichsgruppe	: Verbrühung ohne Therapie
Trasylolgruppe	: 40.000 KIE/kg vor der Verbrühung
Seeanemonengruppe	: 40.000 KIE/kg vor der Verbrühung

Die Tiere wurden unter genau gleichen Bedingungen (Verbrühungsdauer, Applikationszeitpunkt, Applikationsmenge) wie in den eigentlichen Versuchsserien verbrüht.

Es war vorgesehen, alle Tiere 10 Stunden nach der Verbrühung zu töten und zu entbluten, um absolute Vergleichszahlen für jeweils 10 Tiere pro Gruppe zu erhalten. Die jeweiligen Organveränderungen wurden je nach dem Ausmaß und Schweregrad im histologischen Befund mit einem halben bis drei Punkte bewertet. Die Punkte für ein spezifisches Organ wurden dann für das gesamte Behandlungskollektiv addiert und durch die Anzahl der Ratten dieses Kollektivs dividiert.

Da aber einige von den Tieren schon vor der 10. Stunde nach der Verbrühung starben, sind die Bewertungspunkte in Tabelle S. 109 keine absoluten Vergleichszahlen, sondern Schockindices der betreffenden Organe.

Die Addition aller Indices in jedem Behandlungskollektiv ergibt als Summe eine Zahl (letzte Spalte rechts in der Tabelle S. 109), die mit dem morphopathologischen Zustand - insbesondere der Schädigungsintensität - gut in Beziehung steht (Schädigungsindex). Je höher dieser Index, desto größer Ausmaß und Schweregrad der Schädigung.

Diese starke Vereinfachung und Schematisierung läßt sich im Interesse der Übersichtlichkeit nicht vermeiden.

Die Ratten wurden in einer Chloralhydratnarkose entblutet. Zur Entblutung wurde das Peritoneum eröffnet und das Blut mit einer Kanüle und Einmalspritze aus der Bauchorta abgesaugt. Die anschließend entnommenen Organe (Leber, Niere und Lunge) wurden sofort von uns in 10 %igem Formalin fixiert.

Im Pathologischen Institut der Universität München wurden die Organe dann weiter präpariert, die Schnitte hergestellt und die notwendigen Färbungen vorgenommen.

10.2. Begründung der Methode

Als Narkoticum wählten wir Chloralhydrat. Chloralhydrat läßt sich sehr gut dosieren und bewirkt keine Lungenveränderungen, wie sie nach Äthernarkosen beobachtet wurden.

Mit der anschließenden Entblutung in Narkose durch Punction der Bauchaorta, wollten wir eine Blutaspiration vermeiden, die ab und an bei Dekapitation und nachfolgender Entblutung festgestellt worden war.

Der Zeitraum bis zur Entblutung wurde von uns auf die 10. Stunde nach Traumasetzung festgesetzt, da nach unseren bisherigen Versuchsergebnissen innerhalb dieser Zeit die entscheidenden pathophysiologischen Vorgänge ablaufen. Allerdings ist ein noch früherer Zeitpunkt für eine Auslösung schwerer Organläsionen wahrscheinlich zu kurz (125).

Wir wählten einen definierten Zeitpunkt zur Entblutung, um möglichst optimale, vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Dieses Vorgehen war uns auch von Herrn Prof. SCHAUER (Path. Institut der Universität München) empfohlen worden.

Die Methode von HEY und LANGER (82), die zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt spontan gestorbene Tiere für die Histologie aufarbeiteten, verfälscht nach unserer Meinung das histologische Bild aus drei Gründen:

1. Die Schwere der Organveränderungen im Schock ist abhängig von der Zeit.
2. Die Organe können nach einem spontanen Tod nicht mehr ausreichend entblutet werden.
3. Zu Organveränderungen im Schock addieren sich postmortale Veränderungen.

Zur Auswertung der histologischen Schnitte ist noch anzumerken, daß Herr Dr. REMBERGER, ohne Kenntnis der Versuchsgruppen und jeweiligen Medikation, die histologi-

schen Schnitte bewertete. Es handelte sich somit um eine Blindbewertung.

10.3. Parameter der histologischen Beurteilung

An Lunge, Niere und Leber wurden folgende histopathologische Veränderungen semiquantitativ ausgewertet:

Lunge: Hyperämie, Parenchymlutungen, intravasale Thromben (Thrombozyten und Fibrin), Endothelnekrosen, Gefäßwandödem, perivaskuläres- und interstitielles Ödem, Teilatelektasen.

Niere: Schockäquivalente (Tubulusdilataion, Abflachung der Tubulusepithelien, Kollaps der Glomerulumschlingen), Tubulusnekrosen, Erythrozyten- und Proteinzylinder, Hyperämie und intravasale Thromben.

Leber: Hyperämie, Thromben, Parenchymnekrosen und Endothelnekrosen.

10.4. Ergebnisse

10.4.1. Lunge

An diesem Organ zeigte sich unter Bezug auf Hyperämie, Teilatelektasen sowie interstitielles-, perivaskuläres- und Gefäßwandödem kein signifikanter Unterschied innerhalb der einzelnen Versuchstiergruppen (Trasylol, Seeanemone, Vergleichsgruppe).

Gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren fand sich jedoch erwartungsgemäß eine signifikante Erhöhung der Hyperämie, des interstitiellen-, perivaskulären- und Gefäßwandödems.

Parenchymlutungen traten bei den behandelten Versuchstieren signifikant seltener auf, wobei sie nach Trasylol halb so häufig waren und nach Seeanemoneninhibitor sogar

auf ein Viertel reduziert waren.

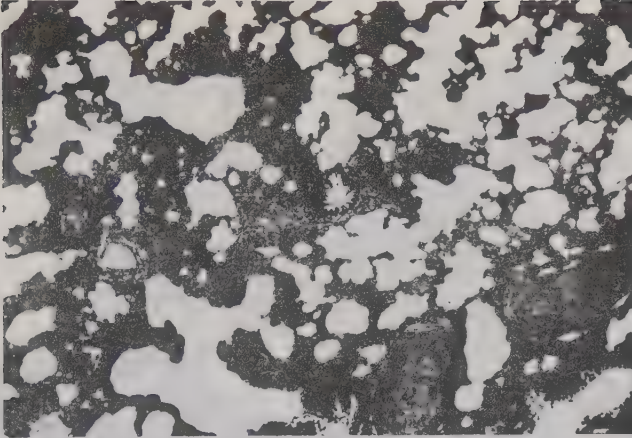


Abb. 23: Lungenveränderungen nach Verbrühungsschock:
Thromben, Teilatelektasen, interstitielles
Ödem, Hyperämie, dystelektatische Bezirke.

Interessanterweise konnte dagegen nach Seeanemonenin-
hibitor eine leichte Vermehrung der intravasalen Mikro-
thromben nachgewiesen werden.

Gefäßendothelnekrosen waren nach Trasylol auf etwa ein
Drittel und nach Seeanemoneninhibitor auf etwa die
Hälfte reduziert nachweisbar, gegenüber der unbehandel-
ten aber verbrühten Vergleichsgruppe.

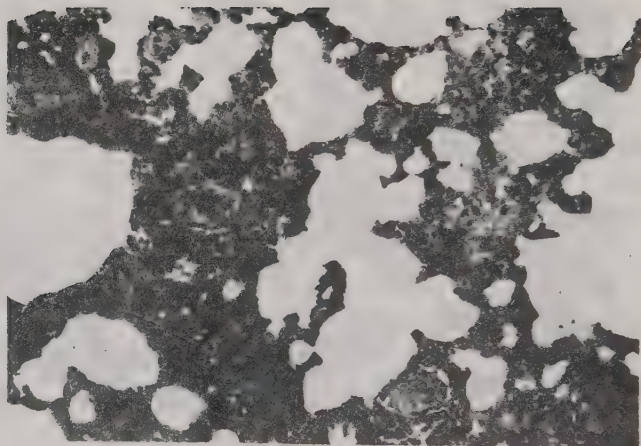


Abb. 24: Lungenveränderungen nach Verbrühungsschock: Thromben, Teilatelektasen, interstitielles Ödem, Hyperämie, dystelektatische Bezirke.

10.4.2. Niere

An den Nieren sahen wir keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen unter Bezug auf Hyperämie, Tubulusdilatation und Glomeruluskollaps. Diese Parameter waren lediglich bei den Kontrolltieren (keine Verbrühung) ganz niedrig bzw. nicht vorhanden.

Tubulusnekrosen finden sich nach Trasylol nur etwa halb so häufig, nach Seeanemoneninhibitor sogar um ein Drittel weniger als bei unbehandelten Versuchstieren der Vergleichsgruppe.

Wie schon an der Lunge, so ließen sich auch an der Niere nach Behandlung mit Seeanemoneninhibitor vermehrt

intravasale Thromben nachweisen.

Hier sogar fünfmal so häufig wie bei der Vergleichsgruppe, nach Trasylol etwa doppelt so häufig. Insgesamt war jedoch die Anzahl der intravasalen Mikrothromben wesentlich geringer als in der Lunge.

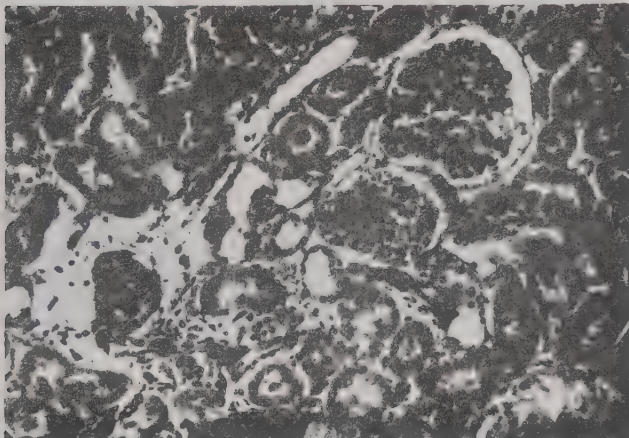


Abb. 25: Nierenveränderungen nach Verbrühungsschock: Frisches fibrinöses Material, dilatierte Venolen mit Erythrocyten, Blutaustritte und Hyperämien.

Erstaunlicherweise fanden sich Erythrozytenzylinder und Eiweißzylinder bei behandelten Versuchstieren häufiger als bei unbehandelten, und zwar nach Trasylol fast dreimal, nach Seeanemoneninhibitor fast doppelt so häufig.

10.4.3. Leber

An der Leber fanden wir auch bei den Tieren der Kontrollgruppe immer eine mäßige Hyperämie. Sie war noch gering gesteigert bei den Tieren der Vergleichsgruppe und auch bei den Behandlungskollektiven. Die Hyperämie erscheint

hier jedoch nach Trasylol weniger ausgeprägt als nach Seeanemoneninhibitor.

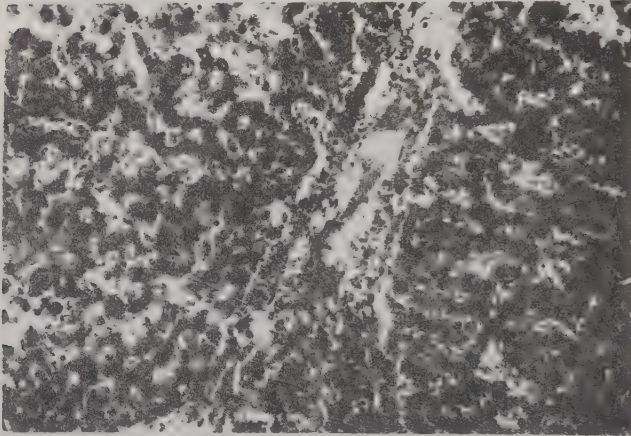


Abb. 26: Leberveränderungen nach Verbrühungsschock:
Hyperämie, Fibrinablagerungen, Erythrozyten-
extravasate, hyperämische Kapillaren, gestau-
te Venolen und beginnende Parenchymnekrosen.

Die intravasalen Mikrothromben waren lediglich nach Trasylol auf etwa die Hälfte reduziert. Insgesamt jedoch ließen sich nur wenige Mikrothromben, ähnlich wie in der Niere, nachweisen.

Endothelnekrosen der portalen Gefäße waren nach Seeanemoneninhibitor um ein Drittel bis zur Hälfte vermindert, nach Trasylol sogar um den Faktor 10 reduziert.

Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei den Parenchymnekrosen, wobei auch hier nach Seeanemoneninhibitor Einzel- und Gruppenzellnekrosen um etwa ein Drittel abnahmen, nach Trasylol sogar auf ein Viertel des Ausgangswertes reduziert waren.

	Hyperämie	Blutungen	Thromben	Endothel- nekrosen	Interstit. perivask. Ödem, Gefäß- wandödem	Dystelektas- en	Schock- äquivalente	Tubulus- nekrosen	Ery- und Protein- zylinder	Hyperämie	Thromben	Hyperämie	Thromben	Karunkel- nekrosen	Endothel- nekrosen	Gesamt
<u>Kontrakt.</u> <u>keine Ver-</u> <u>änderung</u> <u>keine</u> <u>Veränderung</u> <u>5 Ratten</u>	Ø	Ø	Ø	Ø	0,6	3,8	Ø	Ø	Ø	0,2	Ø	1	Ø	0,3	Ø	5,0
<u>Varicelös-</u> <u>ung</u> <u>Veränderung</u> <u>check ohne</u> <u>Therapie</u> <u>5 Ratten</u>	1,5	1,1	1	0,05	4	3,5	1,1	1,4	0,8	1,1	0,1	1,8	0,12	1,25	1,2	21,1
<u>Tracylöl</u> <u>100.000 IE/kg</u> <u>injiziert</u> <u>Nierengefäß</u> <u>8 Ratten</u>	1,7	0,5	0,7	0,3	4,7	4,1	1	0,8	2	1,4	0,14	1,2	0,07	0,5	0,14	10,5
<u>Leetone</u> <u>100.000 IE/kg</u> <u>7 Ratten</u>	2	0,28	1,35	0,42	3,5	3,5	1,2	1,07	1,5	1,2	0,55	1,9	0,14	0,8	0,7	20,01
L	U	N	G	E	E		N	I	E	R	E	L	E	B	S	R

Tab.: Histologische Lungen-, Leber- und Nierenveränderungen bei
Verbrühungsschock-Experimenten mit Ratten

10.5. Zusammenfassung

Die experimentell signifikanten Erfolge des Seeanemoneninhibitors und des Trasylol wurden auch durch die Histologie und Pathologische Anatomie deutlich bestätigt. Insbesondere Endothel- und Parenchymnekrosen, Blutungen und intravasale Mikrothromben waren seltener nachweisbar als bei unbehandelten Tieren der Vergleichsgruppe.

Der Inhibitor aus Seeanemone erwies sich in vielen histologischen Parametern dem Trasylol gleichwertig, wobei die Nieren- und Lungenschnitte unter Seeanemonentherapie, die Leberschnitte nach Trasylol ein etwas besseres Ergebnis zeigten.

11. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, die therapeutische und prophylaktische Wirkung von Trasylol, Heparin, der Kombination Trasylol/Heparin und des neuen Inhibitors aus Seeanemone bei Verbrühungen zu erproben.

Diese Untersuchungen führten wir aus folgenden Gründen am Verbrühungsschockmodell der Ratte durch:

1. Relativ geringer labortechnischer, operativer Aufwand;
2. Exakte Reproduzierbarkeit der Verbrühung;
3. Große Versuchsserien in relativ kurzer Zeit;
4. Statistische Auswertbarkeit und Verifizierbarkeit bei genügend großen Versuchsserien;
5. Überlebensrate (in %) und Überlebenszeit sind exakt zu bestimmen und trotz ihrer Einfachheit die wichtigsten therapeutisch deutbaren Kriterien.

Die von uns an diesem Verbrühungsschockmodell ermittelten Ergebnisse lassen sich auch auf andere Schockformen übertragen. Bei allen Formen werden drei Systeme aktiviert:

- Das Kininsystem,
- das Gerinnungssystem und
- das fibrinolytische System.

Die Parameter Überlebenszeit, Überlebensrate und die histologischen Veränderungen einiger Organe gestatteten uns die Beeinflussung dieser Systeme durch die jeweils verabreichten Pharmaka zu untersuchen.

11.1. I. Versuch: Heparin / Trasylol

Schon RAPAPORT fand durch experimentelle Untersuchungen die Theorie bestätigt, daß es sich bei der Lungenkomplikation nach Verbrennungen um eine Embolisation durch Aggregate von Fibrin und Thrombozyten handelte.

Bei einem Verbrennungsversuch an Ratten konnte er die Todesrate bei den nicht heparinisierten Tieren von 90 % durch Antikoagulantienanwendungen auf 25 % senken (156).

In einer klinischen Untersuchung erreichte SALIBA ebenfalls bessere Heilung der Verbrennungswunden unter alleiniger Heparintherapie (164).

Auch andere Autoren (22, 45, 74) konnten mit der alleinigen Gabe von Heparin bereits gute Resultate vorweisen. Sie erklärten den guten Heilungserfolg des Heparin mit seiner entzündungshemmenden, antihistaminischen sowie proteinasenhemmenden Wirkung.

Inzwischen schritt die Forschung auf dem Gebiet des Schocks weiter fort. Man weiß jetzt, daß es speziell beim Verbrennungsschock zu einer massiven Aktivierung des HAGEMAN-faktors und damit zu einer Aktivierung des Gerinnungs- und Fibrinolysesystems kommt (sh. S. 20).

Ebenfalls werden proteolytische Enzyme freigesetzt, die ihrerseits eine Aktivierung des Gerinnungssystems bewirken. Diese Vorgänge führen zu einer Hyperkoagulabilität, meist gefolgt von einer Hypokoagulabilität mit ausgedehnten intravasalen Gerinnungsvorgängen (DIC). Tritt dabei eine kritische Verminderung des Hämostasepotentials auf, hat dies eine haemorrhagische Diathese zur Folge (sh. S. 14).

Ausgangspunkt unserer Überlegungen war, mit dem Antikoagulans Heparin eine disseminierte intravasale Gerinnung zu verhindern bzw. sie zu mildern. Wie schon auf S. 47 beschrieben, besitzt Heparin u.a. nicht nur eine Antithrombinwirkung, sondern greift bereits bei niedriger Dosierung in die Vorphase der Gerinnung ein (211). Dadurch kann eine Hyperkoagulabilität und eine sich anschließende intravasale Gerinnung verhindert werden (152).

Die Ergebnisse unserer Versuchsreihen bestätigen diese

Überlegungen: Die Überlebensrate von mit Heparin therapierten Ratten ist gegenüber unbehandelten Tieren erhöht (35 % der Heparin-Gruppe überleben gegenüber 0 % der Kontrollgruppe). Statistisch zeigt sich eine hohe Signifikanz unter dem 1 % Niveau. Im direkten Vergleich zu mit Trasylol behandelten Tieren erreichte Heparin in diesem Versuch die gleiche Überlebensrate wie Trasylol (35 %) und zeigt auch statistisch keine signifikante Abweichung.

Bei unserem Tierexperiment kam es in der Kontrollgruppe, die von uns nicht therapiert wurde, rasch zu einer ungehemmten Freisetzung von Proteinasen und anderen Enzymen und im weiteren Verlauf auch zu einer DIC.

Eine physiologische Gegenregulation war dann nicht mehr möglich, was durch die hohe Mortalitätsrate von 14 toten Ratten in den ersten 8 Stunden bestätigt wird. Zu diesem Zeitpunkt lag die Mortalität der Heparin- bzw. Trasylol-Gruppe wesentlich niedriger (sh. Diagramm S. 80). Es zeigt sich aus dieser Gegenüberstellung die Bedeutung der frühen Applikation eines wirksamen Pharmakons. Während die Überlebenskurve der unbehandelten Kontrollgruppe zwischen der 2. und 7. Stunde am stärksten abfällt, ist dieser Kurvenknick in der Trasylol- bzw. Heparinkurve erst zwischen der 10. und 13. Stunde festzustellen. In diesem Zeitraum zeigt das Diagramm zusätzlich noch eine leichte Überlebenszeitverlängerung der Heparin-Gruppe gegenüber der Trasylol-Gruppe. Dieser Abweichung maßen wir jedoch keine Bedeutung zu, da sie statistisch nicht signifikant war.

Insgesamt gesehen zeigen sowohl die Heparin- als auch die Trasylolkurven nach der Injektion des jeweiligen Pharmakons einen gegenüber der Kontrollgruppe stark verzögerten aber stetigen Abfall.

Ab der 18. Stunde nach Traumasetzung ändert sich bei

beiden Vergleichskurven nichts mehr am Verlauf. Es ist somit bereits frühzeitig eine Stabilisierung der überschießenden enzymatischen Reaktionen erreicht worden.

Man kann nach diesem Ergebnis also sagen: Eine Therapie der Verbrennungskrankheit nur mit Heparin erhöht die Überlebensrate gegenüber einer unbehandelten Tiergruppe bereits signifikant.

Dieser positive Einfluß auf den Ablauf eines Schockgeschehens beruht beim Heparin vornehmlich auf der Verhinderung einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC).

11.2. II. Versuch: Heparin und Trasylol / Heparin

Ausgangspunkt der Überlegung für diesen Kombinationsversuch war, daß Trasylol in anderen Phasen des Pathomechanismus der Verbrennungskrankheit eingreift als Heparin. Falls man beide Mittel zusammen verabreicht, müßte es daher einen additiven Effekt im Hinblick auf die Überlebensrate geben: Es müßten also bei der Kombination mehr Tiere überleben, als wenn man jedes Medikament einzeln gäbe.

Während, wie schon oben erwähnt, die wichtigste Aufgabe des Heparin die Verhinderung einer DIC bleibt, seien an dieser Stelle nochmals (sh. auch S. 32 ff) die Wirkungen von Trasylol mit seiner proteinasenhemmenden Eigenschaft zusammengefaßt:

1. Antithromboplastisch,
2. antifibrinolytisch (hemmend auf Plasmin),
3. permeabilitätssenkend (hemmend auf Kinin),
4. zirkulationsfördernd und
5. senkend auf hohe Lipidwerte.

Wichtig ist, daß Trasylol die proteolytischen Enzyme nicht vollständig hemmt, sondern einen reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplex bildet, der dem Massenwirkungsge-

setz unterliegt (65). Damit kommt es zu einem sinnvollen Bremsen der überschießenden proteolytischen Aktivität.

Gerade im Zusammenhang mit Trasylol muß die Auswirkung der Thrombinhemmung durch Heparin auf fibrinogen-unabhängige Gefäßwandeffekte des Thrombins beachtet werden (132). Ein möglicherweise entscheidender negativer Effekt liegt in der durch die heparinbedingte Gerinnungshemmung hervorgerufenen Steigerung der Permeabilität des Gefäßendothels. Dieser vasotrope Effekt könnte die Verhältnisse in der Endstrombahn entscheidend verschlechtern, im Sinne einer nun durch Extravasation zusätzlichen Strömungsbehinderung.

Der Vorteil einer Kombination des Heparin mit Trasylol liegt nun darin, daß sich durch Trasylol diese Permeabilitätssteigerung verringern bzw. wieder der Norm nähern läßt (EIGLER und STOCK (37)). Nach EISENBACH (40) spielt hierbei eine Schutzwirkung des Trasylol auf die Proteoglykane der Grundsubstanz und Basalmembran eine bedeutsame Rolle. Dies besonders, da auch die Glykokalyx der Endothelzelle zu einem nicht geringen Anteil aus Proteoglykanen aufgebaut ist. Weiterhin hemmt Heparin die kininbildende Aktivität des menschlichen Plasmakallikrein, aber nicht die des Trypsin und Plasmin. Ein Inhibitor für die beiden letzteren aber ist Trasylol.

In diesem sich ergänzenden Wirkungsspektrum vermuten wir ebenfalls eine Erklärung für die additive Wirkung von Trasylol und Heparin.

Bereits HABERLAND, KOSŁOWSKI und MATIS berichten von einer Behandlung polytraumatisierter Patienten mit Heparin in Kombination mit Trasylol. Sie erreichten eine erhebliche Senkung der Mortalität gegenüber der ohne Therapie belassenen bzw. zu der nur mit Heparin be-

handelten Gruppe (63).

Unsere Ergebnisse bestätigen unsere Annahme, daß beim Verbrühungsschock die Kombination der beiden Medikamente sinnvoll ist.

Mit der kombinierten Medikation konnten wir sowohl die Überlebenszeit als auch die Überlebensrate gegenüber der nur mit Heparin behandelten Gruppe verlängern. 15 Ratten überlebten in der Kombinationsgruppe die 16. Stunde nach Setzen der thermischen Läsion, gegenüber nur 8 Ratten in der Heparin-Gruppe. Am Ende des Versuchs überlebten 10 Ratten der Kombinationsgruppe und 7 Ratten der Heparin-Gruppe, was einer Mortalität von 50 bzw. 65 % entspricht.

Bei der statistischen Berechnung zeigte sich für diese beiden Gruppen eine Signifikanz auf dem 5 % Niveau. Beide Gruppen wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der kein Medikament gegeben wurde, eine hochsignifikante Überlebenszeitverlängerung auf.

Vergleicht man nun noch die "reinen" Heparin-Gruppen aus dem I. und II. Versuch, so wird deutlich, daß eine Dosissenkung von 1000 auf 750 USP/kg zu keiner Resultatsverschlechterung führt. Vermutlich wird bereits mit einer subcutanen Dosis von 750 USP/kg Heparin, 90 Minuten vor dem Trauma verabreicht, ein ausreichend hoher Plasmaspiegel erreicht.

Schlußfolgerungen:

Um die Ergebnisse allerdings weiter zu festigen, müßten noch zahlreiche ähnliche Heparin/Trasylol-Gruppenversuche durchgeführt werden.

Auch WERLE, BRENDL und HABERLAND stimmten in der Frage überein, daß die Wirksamkeit einer kombinierten Trasylol/Heparin-Medikation im Schock weiter experimentell untersucht werden sollte (64).

Aber vielleicht lassen schon diese wenigen Tierversuche folgende Forderung für die Therapie beim Menschen zu:

Heparin sollte in Kombination mit Trasylol schon kurz nach der Verbrühung verabreicht werden. Je früher es verabreicht wird, um so besser kann es seine Wirkung entfalten. Die Befürchtung, daß es durch den antikoagulatorischen Effekt, bei einer Kombinationsgabe von Trasylol und Heparin, in der Verbrennungswunde verstärkt bluten könnte, bestätigte sich bei unseren Versuchen nicht. Durch die Verbrühung war eine weitgehende Verschorfung der im Wundgebiet liegenden Gefäße eingetreten.

Grundsätzlich sollte sich eine Kombinationstherapie Trasylol/Heparin über die ersten 48 Stunden nach dem Trauma erstrecken, da in diesem Zeitraum die entscheidenden pathophysiologischen Mechanismen ablaufen.

Auch bei einiger Ungewißheit, ob eine DIC oder eine primäre Fibrinolyse vorliegt, sollte so vorgegangen werden, als ob es sich um eine DIC handelt.

Sollte, was selten der Fall ist, eine primäre Fibrinolyse zuerst mit Heparin behandelt werden, ändert sich am klinischen Bild wenig. Eine Substitutionstherapie von Gerinnungsfaktoren und eine antifibrinolytische Therapie können dann, wenn es die Situation erfordert, zusätzlich gegeben werden (127).

11.3. III. und IV. Versuch: Seeanemoneninhibitor / Trasylol

Im III. und IV. Hitzeschockversuch untersuchten wir einen bis dahin noch nicht tierexperimentell eingesetzten Proteinaseinhibitor aus der Seeanemone.

Dieser von L. BÉRESS im Jahre 1971 entdeckte Inhibitor für Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikreine besitzt eine ähnliche Tertiärstruktur und ein ähnliches Molekulargewicht wie Trasylol (sh. hierzu auch Kap. 2.9.).

Beim Vergleich der pharmakologischen Eigenschaften von Trasylool und dem Seeanemoneninhibitor fällt auf, daß Trasylool bereits nach 30 - 40 Minuten sein Verteilungsgleichgewicht bei i.v. Injektion erreicht. Trasylool gelangt demnach schneller in den optimalen Wirkungsbereich als der Seeanemoneninhibitor. Dieser erreicht erst nach 3 Stunden sein Verteilungsgleichgewicht, wird dafür aber langsamer eliminiert und bleibt so länger wirksam.

Auch bei der Untersuchung der Eliminationskonzentrationen in Niere und Harn zeigten die beiden Inhibitoren ein unterschiedliches Verhalten (sh. auch Kap. 2.10.). In der Niere werden 1 Stunde nach der Injektion von Trasylool bereits 60 % der injizierten Menge und 4 Stunden danach 80 % nachgewiesen. Hier wird der Inhibitor fast vollständig inaktiviert, nur 2 % werden in aktiver Form ausgeschieden.

Der Seeanemoneninhibitor wird dagegen nach 48 Stunden bereits zu 85 % der injizierten Dosis mit dem Harn eliminiert. Er reichert sich auch nur maximal zu 20 % der injizierten Aktivität in der Niere an. Bereits nach 12 Stunden ist in der Niere keine meßbare Konzentration mehr nachzuweisen. Durch die rasche Ausscheidung und die geringe Bindung an die Nierentubuli wirkt der Seeanemoneninhibitor weniger nierentoxisch und stoffwechselverändernd.

Diese Eigenschaft dürfte sich besonders vorteilhaft bei einer Langzeittherapie auswirken, da unter diesen Bedingungen der Seeanemoneninhibitor nicht wie Trasylool zu erheblichen Nierenrindennekrosen und fibrinreichen glomerulären Thromben führt (82).

Für unsere Versuchsreihen ermittelten wir anhand von Vorversuchen eine wirksame Seeanemoneninhibitor-Dosis von 40.000 KIE/kg.

Ergebnisse:

Mit dieser Dosis konnte die Überlebenszeit signifikant verlängert werden. Außerdem war die für den Versuch insgesamt benötigte Dosismenge klein genug, um nicht die uns nur sehr begrenzt zur Verfügung stehende Inhibitormenge zu übersteigen.

Auf dem Diagramm des III. Versuchs zeigt sich, daß 95 % der Tiere der Seeanemoneninhibitor-Gruppe die ersten 10 Stunden nach dem Setzen der thermischen Läsion überleben. Eine im Vergleich zu den bisherigen Versuchen ungewöhnlich große Zahl. Zwar sterben im Verlauf der folgenden Stunden noch 7 Tiere, doch erreicht diese Gruppe mit 60 % die höchste Überlebensrate der in dieser Arbeit diskutierten Serien.

Die Kurve der analogen Trasylol-Gruppe dieser Serie (Diagramm III. Versuch) erreicht nicht die Kontinuität der Seeanemoneninhibitor-Gruppe. Das liegt an den zum Teil gleichen Überlebenszeiten einiger Trasylol-Ratten. Am Ende des Versuchs überleben nur 5 Trasylol-Ratten gegenüber 12 Seeanemoneninhibitor-Tieren.

Der Seeanemoneninhibitor zeigt in diesem Versuch nicht nur insgesamt ein besseres Ergebnis als Trasylol, sondern senkt vor allem deutlich die Absterberate in den entscheidenden ersten 15 Stunden nach Traumasetzung. Diese günstige Wirkung auf das Schockgeschehen ist besonders bemerkenswert, handelt es sich doch um einen neuen, bisher unbekannten Inhibitor.

Beachtet man die unterschiedliche Wirkungsweise des Trasylol und Seeanemoneninhibitors, so mag vielleicht der langsame Abfall des Seeanemoneninhibitor-Spiegels im Serum ein Grund für das gute Resultat bei den Seeanemonenversuchen sein.

Im IV. Verbrühungsschockversuch konnten wir das Ergebnis des III. Versuchs unter genau gleichen Bedingungen

verifizieren.

Der Seeanemoneninhibitor zeigt im IV. Versuch erneut ein besseres Ergebnis als Trasylol; die Überlebenszeit als auch die Überlebensrate sind größer. Statistisch ergibt sich eine Signifikanz unter dem 1 % Niveau.

Beide, Seeanemoneninhibitor und Trasylol, bewirken nach ihrer Applikation einen stark verzögerten, relativ stetigen Abfall der Kurven.

Man muß annehmen, daß der Seeanemoneninhibitor bei thermisch traumatisierten Ratten ein quantitativ günstigeres Wirkungsspektrum aufweist als Trasylol, bzw. zusätzlich die bereits erwähnten Gesichtspunkte - wie geringere Nierentoxizität - ausschlaggebend sind.

Vergleicht man die Seeanemonenkurven (Diagramm S. 93) aus den Versuchen III und IV, so läßt sich sofort eine weitgehende Ähnlichkeit im Verlauf feststellen. Die beiden Seeanemonenversuche unterscheiden sich bezüglich der Mortalitätsrate um nur 5 %. Damit können die experimentellen Resultate als gesichert angesehen werden.

Gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe läßt sich für beide Seeanemoneninhibitor-Gruppen eine optimale Überlebenszeitverlängerung und eine signifikante Verringerung der Absterberate ablesen (Diagramm S. 93 u. 94).

Die Tatsache, daß in zwei unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchserien der Seeanemoneninhibitor ein jeweils besseres Ergebnis in Bezug auf die Überlebensrate aufweist als Trasylol, läßt erwarten, daß der neuartige Inhibitor auch bei anderen Indikationen dem Trasylol überlegen ist.

Der Inhibitor aus Seeanemone erwies sich in vielen histologischen Parametern dem Trasylol gleichwertig, wobei die Nieren- und Lungenschnitte unter Seeanemonentherapie, die Leberschnitte nach Trasylol ein etwas besseres Ergebnis zeigten.

Der mit vier Maleoylresten substituierte Inhibitor aus Rinderlunge zeigt ein ähnliches pharmakologisches Verhalten wie der Seeanemoneninhibitor, doch stehen die Tierversuche hierzu noch aus (48).

In diesem Zusammenhang soll auf die Arbeit von KWIECINSKI hingewiesen werden, der mit einem Proteinaseinhibitor aus Weinbergschnecken am gleichen Versuchsmodell ebenfalls gute Ergebnisse ermitteln konnte.

Schlußfolgerungen:

Unsere Versuchsergebnisse untermauern die These, daß das Kinin- und Fibrinolysesystem wichtige Faktoren im Ablauf der Verbrennungskrankheit darstellen. Trasylol, Seeanemoneninhibitor und Heparin als Inhibitoren dieser Systeme erhöhen signifikant die Überlebensrate der Versuchstiere. Ihre Applikation im Schock ist deshalb von größter therapeutischer Bedeutung.

Durch unsere Versuche konnte gezeigt werden, daß mit Trasylol und dem Seeanemoneninhibitor sowie der Kombination Trasylol/Heparin eine erfolgreiche Prophylaxe und Therapie eines Verbrühungsschocks erreicht werden kann.

Die bisherige symptomatische Therapie - Volumenersatz, Kreislaufstabilisierung, Antibiotika - kann mit der Entdeckung der Proteinaseinhibitoren ergänzt werden durch eine kausale Therapie: Direkter Eingriff in das Enzymgeschehen.

Diese kausale Therapie muß allerdings so früh wie möglich erfolgen, da in den ersten 24 Stunden nach dem Trauma die entscheidenden pathophysiologischen Mechanismen ablaufen. Notärzte sollten schon am Unfallort eine kausale Schocktherapie einleiten, da bis zur Einlieferung in ein Krankenhaus entscheidende Zeit ungenutzt bleibt.

Bei vorhersehbaren Operationen, mit der Gefahr von Wundheilungsstörungen und Lungenembolien, sollte eine prophylaktische Therapie durchgeführt werden.

Ob sich der neue Inhibitor aus Seeanemone bei weiteren Versuchsreihen und eventuell eines Tages auch bei klinischen Erprobungen bewähren wird, bleibt abzuwarten. Vielleicht aber könnte mit ihm die Therapie der Verbrennungskrankheit erfolgreicher gestaltet werden als bisher.

12. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Das Ziel unserer Untersuchungen bestand darin, pathophysiologische Abläufe bei Verbrennungen zu objektivieren, bestehende Therapiemöglichkeiten zu festigen und neuartige Pharmaka auf ihre Wirksamkeit bei Verbrennungen zu prüfen.

In dieser Arbeit wurden an einem standardisierten Verbrennungsschockmodell das Antikoagulans HEPARIN und ein neuer Proteaseninhibitor aus SEEANEMONE therapeutisch erprobt.

Als Parameter für die Auswertung der Experimente dienten Überlebenszeit, Überlebensrate und histologische Veränderungen verschiedener Organe (Leber, Niere und Lunge).

Als Vergleich dienten uns mit Trasylol behandelte und unbehandelte, verbrühte Tiere.

Die Wirkungen und Ergebnisse des Heparins und Seeanemoneninhibitors wurden diskutiert und zu den pharmakologischen Besonderheiten des Trasylol in Relation gesetzt.

Folgende Schlußfolgerungen ergeben sich daraus:

1. Durch die prophylaktische Gabe von Heparin wird die Überlebenszeit gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe signifikant verlängert.

2. Die kombinierte Gabe von Heparin und Trasylol läßt einen additiven Effekt in der Wirkung erkennen: Überlebenszeit und Rate waren signifikant verlängert.
3. Heparin schützt vor einer DIC und Trasylol hemmt eine übermäßige Freisetzung von Kininen und verhindert eine pathologische Hyperfibrinolyse mit dem Verbrauch von Plasminogen.
4. Der neue Inhibitor aus Seeanemone, entdeckt von BÉRESS, KORTMANN und FRITZ erreichte in zwei Versuchen das beste Ergebnis. Gegenüber mit Trasylol therapierten Ratten war die Überlebensrate signifikant gesteigert.
5. Für den Seeanemoneninhibitor erwies sich als ausreichend wirksame Applikationsmenge bei Ratten eine Dosis von 40.000 KIE/kg und für Heparin von 750 USP/kg.
6. Eine besondere Bedeutung kommt der prophylaktischen Gabe des Seeanemoneninhibitors und des Heparins zu. Offenbar ergibt sich dann eine günstige Konstellation, wenn zum Zeitpunkt des Traumas bereits ein hoher Gewebsspiegel der Pharmaka besteht. Deshalb dürfte es bei Verbrennungen sinnvoll sein, die Pharmaka so früh wie möglich nach dem nicht vorhersehbaren Trauma, also bevor die Schädigungen irreversibel geworden sind, zu injizieren.
7. Der Inhibitor aus Seeanemone erwies sich in vielen histologischen Parametern dem Trasylol gleichwertig. Insgesamt waren nach der Gabe von Trasylol bzw. Seeanemoneninhibitor Endothel- und Parenchymnekrosen, Blutungen und intravasale Mikrothromben seltener nachweisbar als bei unbehandelten Tieren der Vergleichsgruppe.

13. LITERATURVERZEICHNIS

1. ANDERER, F.A.:
Strukturuntersuchungen am Kallikrein-Inaktivator aus
Rinderlunge (Bestimmung der Aminosäuresequenz).
Z.Naturforschung 20:462 (1965).
2. ANFENSEN, C.B., BOYLE, E., BROWN, R.K.:
The Role of Heparin in Lipoprotein Metabolism.
Science 115:583 (1952).
3. ARTURSSON, G.:
Pathophysiological Aspects of the Burn Syndrom with
Special Reference to Liver Injury and Alteration of
Capillary Permeability.
Acta Chir. Scandinav. Supp. 274:1 (1961).
4. ASTRUP, T., CROOKSTEN, J., MACINTYRE, A.:
Proteolytic Enzymes in Blood.
Acta Physiol. Scand. 21:238 (1950).
5. AUHAGEN, J.:
Dissertation, Med. Akademie, Düsseldorf (1964).
6. BACK, N., STEGER, R.:
Activation of Bovine Bradykininogen by Human Plasmin.
Life Science 4:153 (1965).
7. BACK, N., STEGER, R.:
Effect of Inhibitors on Kinin-releasing Activity of
Proteases.
Federation Proc. 27:96 (1968).
8. BACK, N.:
Proteases and Protease Inhibitors in Exp.Shockstates.
Ann.N.Y.of Sci. 146:491 (1968).
9. BACK, N., STEGER, R.:
Effect of Heparin on the Kinin-Forming Activity of
Trypsin, Plasmin and Various Kallikrein.
Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med. Vol.
133/3:740 - 743 (1970).
10. BEGEMANN, H.:
Klinische Haematologie.
Thieme-Verlag, Stuttgart (1974).
11. BELLER, F.K., EPSTEIN, M.D., KALLER, H.:
Distribution, Half Life Time and Placental Transfer
of Trasylol.
Thromb.Diath.Haemorrhag. 16:302 (1966).

12. BÉRESS, L., BÉRESS, R.:
Kieler Meeresforschungen 27:117 - 127 (1971).
13. BÉRESS, L., BÉRESS, R., WUNDERER, G.:
Isolation and Characterisation of Three Polypeptides
with Neurotoxic Activity from Anemonia Sulcata.
FEBS Letters 50:311 - 314 (1975).
14. BÉRESS, L., BÉRESS, R., WUNDERER, G.:
Toxicon. Im Druck (1975).
15. BERKENHEIER, A.:
Dissertation, Med. Fakultät, München (1973).
16. BHARGAVA, N., PABST, W.:
Über die Ausscheidung von Kallikrein - Inaktivator
und sein Verhalten gegenüber Tumorzellen in vivo.
Nutrit et Dieta (Basel) 5:87 (1963).
17. BLÜMEL, G.:
Experimentelle und klinische Untersuchungen posttrau-
matischer Zustände.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
18. BOBBIN, R.P., GUTH, P.S.:
Venoconstrictive Action of Bradykinin.
J. of Pharmacol. and Exp. Therapeutics 160:11 (1968).
19. BRAASCH, D.:
Erythrocytenflexibilität und Capillarkreislauf.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 287:130 (1963).
20. BRECHT, K.:
Über die Wirkung von Trasylol und von anderen vaso-
aktiven Substanzen auf isolierte Arterien und Venen.
Ärztl. Forschung 3:86 (1970).
21. BREDDIN, K.:
Beitrag beim int. Symposium in Vietri sul Mare vom
31. Mai bis 2. Juni 1969.
22. BREHM, R., JANISCH, H.:
Heparintherapie der EPH-Gestose. Parallelität zur
Therapie der Verbrauchskoagulopathie.
Dtsch. med. Wschr. 97:417 (1972).
23. BROERSMA, R.J., BULLEMER, G.D., MAMMEN, E.F.:
Acidosis Induced Disseminated Intravascular Micro-
thrombosis and its Dissolution by Streptokinase.
Thromb. Diathes. Haemorrhag. 24:55 (1970).

24. BROOKS, J.W., EVANS, E.J., HARM, W.T., REID, J.P.:
The Influence of External Body Radiation on Mortality from Thermal Burns.
Am. Surg. 136:535 (1952).
25. BÜTZOW, G.H., LINDNER, J., ZAKI, J.:
Der Experimentelle Schock und seine Therapie mit Trasylol.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
26. CASTENHOLZ, A., ROHEN, J.W.:
Morpholog. Grundlagen der Zirkulation und Permeabilität im Bereich der Endstrombahn.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 3,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1969).
27. CHAMBERS, R., ZWEIFACH, B.W., LOWENSTEIN, B.F.:
Circulation in Tourniquet Shock.
Ann. Surg. 120:791 (1944).
28. CHAUVET, J., ACHER, R.:
The Reactive Site of the Basic Trypsin Inhibitor of Pankreas.
J. Biol. Chemistry 242:4274 (1967).
29. MC CLEERY, R.S., SCHAFFARZICK, W.R., LIGHT, R.:
An Experimental Study of the Effect of Heparin on the Local Pathology of Burns.
Surgery 26:548 - 564 (1949).
30. CLOWES, G.H.A.jr., MACNICOL, M., VOSS, H., ALTUG, K., SARAVIS, C.:
Inhibition by Trasylol of the Production of Plasma Factors (Probably-Peptides) which cause Pneumonitis and Metabolic Disorders in Severe Sepsis.
New Aspects of Trasylol Therapy, Vol. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
31. MC CONNELL, D.J., KAGEN, L.J., BECKER, E.L.:
Use of Heparin in Distinguishing Plasma Kallikrein from Pf/dil.
Proc. of the Soc. for Exp. Bio. and Med. 119:652 (1965).
32. COPE, O., MOORE, F.D.:
Capillary permeability in Burns.
J. of Clin. Invest. 23:24 (1944).
33. CRUNKHORN, P., WILLS, A.L.:
Cutaneous Reactions to Intradermal Prostaglandines.
Brit. J. Pharm. 41:49 (1971).

34. DAVIS, J.H., ABBOTT, W.E.:
The Pathology of Thermal Burns-Changing Concepts.
Surgery 40:788 (1956).
35. DOST, F.H.:
Grundlagen der Pharmakokinetik.
Thieme-Verlag, Stuttgart (1968).
36. DUESBERG, R.:
Die Verbrennungskrankheit.
Hefte Unfallheilkunde 47:27-34 (1954).
37. EIGLER, F.W., STOCK, W.:
Verminderung des postischämischen Extremitätenödems
an der Ratte durch einen Proteinasehemmer.
Klin. Wschr. 46:1283 (1968).
38. EIGLER, F.W.:
Experimentelle Untersuchungen zur Behandlung des
Tourniquet-Syndroms mit Trasylol.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 3,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1969).
39. EISEN, V.:
Hypotensive Peptides.
Springer-Verlag, Berlin - New York (1966).
40. EISENBACH, J.:
Die Problematik des postischämischen Organschadens
am Beispiel der temporären Lungenischämie.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 7,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1974).
41. ELROD, P.D., MC CLEERY, R.S., BALL, O.T.:
An Experimental Study of the Effect of Heparin on
Survival Time Following Lethal Burns.
Surg. Gynecol. Obstet. 92:35-42 (1951).
42. ERB, I.H., MORGAN, E.M., FARMER, A.W.:
Pathology of Burn: Pathologic Picture as Revealed at
Autopsy in Series of 61 Fatal Cases Treated at the
Hospital for Sick Children Toronto.
Ibid 117:234 (1943).
43. ERDÖS, E.G.:
Hypotensive Peptides: Bradykinin, Kallidin and Ele-
doisin.
Advanc. Pharma. 4:1 (1966).
44. FARRINGTON, G.H., SARAVIS, C.A., COSETTE, G.R.,
CLOWES, G.H.A.jr.:
Bloodborne Factors in Experimental Peritonitis.
Surgery 68:136 (1970).

45. FILKINS, J.P., DI LUZIO, N.R.:
Heparin Protection in Endotoxin Shock.
Am. J. Physiol. 214:1074-1077 (1968).
46. FORELL, M.M.:
Zum Problem der Pankreatitis und der Pankreatitistherapie.
Med. Klin. 57:864 (1962).
47. FREY, E.K.:
Zusammenhänge zwischen Herzarbeit und Nierentätigkeit.
Arch. Klin. Chir. 142:663 (1926).
48. FRITZ, H., OPPITZ, K.H., MECKL, D., KEMKES, B.,
HAENDLE, H., SCHULT, H., WERLE, E.:
Verteilung und Ausscheidung von Proteaseninhibitoren
nach i.v. Injektion.
Z. Physiol. Chem. Bd. 350:1541-1550 (1969).
49. FRITZ, H., TSCHESCHE, H.:
Proceedings of the Int. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors.
De Gruyter-Verlag, Berlin - New York (1971).
50. FRITZ, H., BREY, B., BÉRESS, L.:
Polyvalente Isoinhibitoren für Trypsin, Chymotrypsin,
Plasmin und Kallikreine aus Seeanemonen. Isolierung,
Hemmverhalten und Aminosäurezusammensetzung.
Z. Physiol. Chem. 353:19-30 (1972).
51. FRITZ, H.:
Bisher unveröffentlicht.
52. FRITZ, H.:
In Vorbereitung.
53. GANONG, F.W.:
Medizinische Physiologie.
Springer-Verlag, Berlin - New York (1971).
54. GAZZANIGA, A.B., CONNOR, N.E.:
Effects of Intravenous Infusion of Autologous Kidney
Lysosomal Enzymes in the Dog.
Ann. Surg. 172:804 (1970).
55. GLASKO, A.J., FERGUSON, J.H.:
Inhibition of Tryptases by Heparin.
Proc. of the Soc for Exp. Biol. and Med. 45:43 (1940).
56. GLENN, T.M., LEFER, A.M.:
Modification of the Deleterious Actions of Lysosomal
Hydrolases in Circulatory Shock by Trasylol.
New Aspects of Trasylol-Therapy, Vol. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).

57. GREEN, B.E., ARTZ, C.P.:
An Appraisal of Heparin in Burns: Experimental Study.
Surg. Forum 10:343-346 (1959).
58. GREENWALD, H.M., ELIASBERG, H.:
The Pathogenesis of Death from Burns.
Amer. J. of med. Sci. 171:682 (1926).
59. GREUER, W.:
Zur Pathophysiologie und Therapie der Verbrennungs-
krankheit.
Bruns Beitr. Klin. Chir. 198:257 (1959).
60. GREUER, W.:
Die proteolytischen Enzyme im Krankheitsgeschehen.
Editio Contor (1962).
61. GRISOLA, A., FORREST, W.F., PELTIER, L.F.:
The Treatment of Fractures Complicated by Burns.
Experimental Study. 3:259-264 (1963).
62. GRÖZINGER, K.H., BLÜMEL, G.:
Experimentelle Untersuchungen bei der durch Fettemul-
sionen ausgelösten Pankreatitis der Katze.
Wiener klin. Wschr. 48:847-853 (1966).
63. HABERLAND, G.L., KOSLOWSKI, L., MATIS, P.:
Trasylol in der Schocktherapie.
Med. Welt 23:1049-1056 (1972).
64. HABERLAND, G.L., BRENDDEL, W.:
Schlußbemerkungen.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
65. HABERLAND, G.L.:
Eine kurze Betrachtung zum Konzept der Enzyminhibition.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 6,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1973).
66. HABERMANN, E.:
Über Zusammenhänge zwischen esterolytischen und phar-
makologischen Wirkungen von Jararacagift, Kallikrein
und Thrombin.
Naunyn Schmiedebergs Arch. Exper. Path. u. Pharmak.
236:492 (1959).
67. HABERMANN, E., KLETT, W.:
Reinigung und einige Eigenschaften eines Kallikreins
aus Schweineserum.
Biochem. Z. 346:133 (1966).

68. HADDY, F.J.:
Vasomotion in Systemic Arteries, Small Vessels and Veins Determined by Direct Resistance Measurements.
Minn. Medic. 1958:162-170.
69. HALSE, Th.:
Aktivierung der Fibrinolyse und Thrombolyse durch Polysaccaridschwefelsäureester (Heparin, Heparinoide).
Arzneim.-Forsch. 12:574 (1962).
70. HAMBURG, U.:
Plasma, Protease and Kinin Release with Special Reference to Plasmin.
Ann. of the N.Y. Acad of Sci. 146:517 (1968).
71. HARDAWAY, R.M.:
The Role of Intravascular Clotting in the Etiology of Shock.
Ann. Surg. 155:325-338 (1962).
72. HARDAWAY, R.M., JAMES, P.M., ANDERSON, R.W., BREDENBERG, C.E., WEST, R.L.:
Intensive Study and Treatment of Shock.
Man. J. Amer. med. Ass. 199:779 (1967).
73. HARDAWAY, R.M.:
Haemodynamic Compensation as Therapy of Microcirculatory Disturbances.
Microcirculation, Haemostasis and Shock.
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1970).
74. HARDAWAY, R.M.:
The Role of Intravascular Clotting in the Etiology of Shock.
Ann. Surg. 155:325-338 (1972).
75. HEENE, E., SCHULTIS, K.:
Therapie der erworbenen haemorrhagischen Diathesen.
Med. Welt. 19:985 (1968).
76. HEENE, D.L.:
Zur Diagnostik der Verbrauchskoagulopathie.
Bibliotheca haemat. 32:270 (Basel) (1970).
77. HEIDEMANN, M., BERGENTZ, S.E., LEWIS, D.H., LJUNGQVIST, U.:
Der Effekt von Trasylol auf die Thrombozytenreaktion nach Trauma.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
78. HEIMBURGER, N., TROBISCH, H.:
Blutgerinnung und Fibrinolyse.
Angewandte Chemie 3:89-120 (1971).

79. HELLER, W.:
Über die Fettembolie.
Med. Welt. 22:1282 (1969).
80. HENNING, K.:
Dissertation.
Med. Fakultät, München (1962).
81. HERSCHLEIN, H.J., STEICHELE, D.F.:
Unterschiedliche Formen der Verbrauchskoagulopathie
und ihre Behandlung
Med. Welt 44:2389 (1969).
82. HEY, D., LANGER, P.:
Wirkungen und Nebenwirkungen beim Einsatz von Heparin,
Plasmin, Epsilon-Aminocapronsäure und Trasylol im Ver-
brührungsschock.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
83. HOLZACH, P., BIEDERMANN, H.P., HOHL, M., HASSE, J.,
RITTMANN, W.W., GRUBER, U.F., STÄHELIN, H.B.:
Untersuchungen des Fettstoffwechsels bei Traumatpatienten.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
84. HORN, L.:
Experimental Shock.
Ed.: Reconstructive Plastic Surgery.
Philadelphia, W.B. Saunders Co. (1964).
85. HORTON, E.W.:
Human Urinary Kinin Excretion.
Brit. J. of Pharm. 14:125 (1959).
86. HORWITT, M.K.:
The Anti-Tryptic Properties of Heparin.
Science 92:89 (1940).
87. HÜNNEMEYER, F.:
Verbrauchskoagulopathie.
Diagnostik 6:67-69 (1973).
88. HUTH, K.:
Fettstoffwechselstudien bei der experimentellen Fett-
embolie.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
89. ILLIG, L.:
Die terminale Strombahn.
Springer-Verlag, Berlin - New York (1961).

90. JANOFF, A., WEISSMANN, G., ZWEIFACH, B.W., THOMAS, L.:
Pathogenesis of Experimental Shock.
J. of exp. Med. 116:451 (1962).
91. JAWORSKA, M., HANC, I.:
Cerebral Tissue Reaction to Burn Trauma in Children.
Acta chir. plas. (Praha) 7:52 (1965).
92. KALEY, G., WEINER, R.:
Prostaglandine E₁: A Potential Mediator of the Inflammatory Response.
Ann. of the N.Y. Acad. of Sci. 180:338 (1971).
93. KALLER, H.:
Tierexperimentelle Untersuchungen über Wirkungsdauer und Elimination von Trasylol.
Arch. Exp. Pathol. and Pharmakol. 246:92 (1963).
94. KALLER, H.:
Die Beeinflussung experimentell erzeugter Ödeme durch Trasylol.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 1,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1965).
95. KARLSON, P.:
Biochemie,
Thieme-Verlag, Stuttgart (1974).
96. KASSEL, B., LASKOWSKI, M.:
The Basic Trypsin Inhibitor of Bovine Pankreas.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 20:463 (1965).
97. KAULLA v., K.N., MC DONALD, T.S.:
The Effect of Heparin on Components of the Human Fibrinolytic System.
Blood 13:811 (1958).
98. KELLER, R., TIMME, W., DISSMANN, W., BUSCHMANN, H.J.,
DROSS, K., DANGS, J.:
Thalliumvergiftung und Verbrauchskoagulopathie.
Schweiz. med. Wschr. 101:511 (1971).
99. KILIAN, J., DÖLP, R., REINEKE, H., AHNEFELD, F.W.:
Der Einfluß von Trasylol im exp. hämorrhagischen Schock auf Kreislaufkriterien und metabolische Größen.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
100. KING, T.C., REYNOLDS, I.E., PRICE, P.B.:
Local Edema and Capillary Permeability Associated with Burn Wounds.
Forum 6:80 (1955).

101. KLINE, D.L.:
The Purification and Crystallization of Plasminogen
(Profibrinolysin).
J. of Biol. Chemistry 204:574 (1962).
102. KORN, E.D.:
Properties of Clearing Factor Obtained from Rat Heart
Acetone Powder.
Science 120:399 (1954).
103. KORN, E.D.:
Clearing Factor, a Heparin - activated Lipoprotein
Lipase - Isolation and Characterization of the Enzy-
me from Normal Rat Heart.
J. of Biol. Chemistry 215:1 (1955).
104. KORN, E.D.:
Inactivation of Lipoprotein Lipase by Heparinase.
J. of Biol. Chemistry 226:827 (1957).
105. KORN, E.D., Quigley, T.W.:
Lipoprotein Lipase of Chicken Adipose Tissue.
J. of Biol. Chemistry 226:833 (1957).
106. KORTMANN, H., FRITZ, H.:
In Vorbereitung.
107. KOSLOWSKI, L.:
Verbrennungen und ihre Behandlung.
Med. Welt 20:1263 (1969).
108. KUNITZ, M.:
Isolation of a Crystalline protein Compound of Tryp-
sin and of Soybean Trypsin Inhibitor.
J. of Gen. Physiol. 30:311 (1947).
109. KUSCHINSKY, G., LÜLLMANN, H.:
Lehrbuch der Pharmakologie.
Thieme-Verlag, Stuttgart (1970).
110. KWIECINSKI, G.:
Dissertation, Med. Fakultät, München.
In Vorbereitung (1975).
111. LASCH, H.G., KRECKE, H.J., RODRIGUEZ-ERDMANN, F.,
SESSNER, H.H., SCHÜTTERLE, G.:
Verbrauchskoagulopathien (Pathogenese und Therapie).
Folia haemat. 6:1 (1961).
112. LASCH, H.G.:
Schock, Hämostase und Mikrozirkulation.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 3,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1969).

113. LASCH, H.G., HUTH, K., HEENE, L.L.,
MÜLLER-BERGHAUS, G., HÖRDER, M.H., JANZARIK, H.,
MITTERMAYER, C., SANDRITTER, W.:
Die Klinik der Verbrauchskoagulopathie.
Dtsch. med. Wschr. 17:715 (1971).
114. LEFER, A.M., MARTIN, J.:
Origin of a Myocardial Depressant Factor in Shock.
Amer. J. Physiol 218:1423 (1970).
115. LEFER, A.M., GLENN, T.M., LOPEZ-RASI, A.M.,
KIECKEL, S.F., FERGUSON, W.W., WANGENSTEEN, S.L.:
Mechanism of the Lack of a Beneficial Response to
Inotropic Drugs in Hemorrhagic Shock.
Chlin. Pharmacol. Therap. 12:506 (1971).
116. LEFER, A.M., GLENN, T.M.:
The Interrelationship Between Splanchnic Blood Flow
and a Myocardial Depressant Factor in Circulatory
Shock.
In: The Splanchnic Circulation in Shock.
Ed.: D.G. Reynolds, K. Swan. Prentice-Hall (1971).
117. LEFER, A.M., GLENN, T.M.:
Effect of Trasylol on the Production of a Myocardial
Depressant Factor in Circulatory Shock.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
118. LEVENSON, S.M., LUND, C.C.:
Thermal Burns.
DM Oct. (1957).
119. LEVEY, S., SHEINFELD, S.:
Gastroenterologia 27:625 (1954).
120. LEWANDOWSKI, Z.:
Dissertation, Med. Fakultät, München.
In Vorbereitung (1974).
121. LEWIS, G.P.:
Handbook of Exp. Pharmacologie 25:516.
Springer-Verlag, Berlin - New York (1970).
122. LEWIS, D.H., NOLTE, J., SANDEGARD, J., FONDBERG, L.,
SEEMANN, T.:
Local Regulatory Factors and Skeletal Muscle Blood
Flow Immediately after Trauma.
New Aspects of Trasylol Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).

123. LIESEN, H., HOLLMANN, W.:
Arbeitsuntersuchungen über die Wirkung des Proteinaseinhibitors auf Kardiopulmonale und Stoffwechselparameter.
Med. Welt 36:1381 (1971).
124. LILLEHEI, R.C., LONGERBEAM, J.K., BLOCK, J.H.,
MANAX, W.G.:
Haemodynamic Changes in Endotoxin Shock.
In: Shock and Hypotension Pathogenesis and Treatment,
edited by L.C. Mills, J.H. Moyer.
Grune Strattonop. 442-462 (1965).
125. LORTHIOIR, H., LEY, R., SCHNELLS, G.:
Vorläufige Untersuchung über die Wirkung des Proteinaseinhibitors Trasylol auf Organschäden beim Verbrennungsschock der Ratte.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
126. LUDWIG, H.:
Verbrauchskoagulopathie in der Geburtshilfe.
Med. Klin. 46:2005 (1970).
127. MARDER, V.J.:
Pathophysiologie und Therapie der DIC.
Internist 14:536-542 (1973).
128. MARGARETTEN, W., MC KAY, D.G., PHILLIPS, L.L.:
Effectors of Heparin on Endotoxin Shock in Rats.
Am. J. Pathol. 51:61-68 (1967).
129. MARX, R., CLEMENTE, P., WERLE, E., APPEL, W.:
Zum Problem eines Antidotes in der internen Thrombotherapie mit Fibrinolytika.
Blut 5:367 (1959).
130. MASSION, W.H., BLÜMEL, G., PESCHL, L.:
Die Bedeutung proteolytischer Enzyme bei refraktärer Hypotension.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
131. MATIS, P.:
Internationales Symposium über Proteinaseinhibition in der Schockbehandlung.
Med. Welt 51:2037 (1971).
132. MATIS, P.:
Proteaseninhibition in der Schock-Therapie.
Med. Welt 49:1963 (1973).

133. MATIS, P., HABERLAND, G.L.:
Vasotrope Effekte von Antikoagulantien und Fibrinolytika unter Berücksichtigung der Schocktherapie.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 6,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1973).
134. MAURER, P., SCHERER, H., MACK, D.:
Verminderung des postischämischen Extremitätenödems nach wiederherstellenden Arterienoperationen durch den Proteinaseinhibitor Trasylol.
Med. Welt 2:85 (1971).
135. MONTIGEL, C.:
Wissenschaftliche Tabellen.
Geigy A.G., Basel.
136. MORIWAKI, C., SCHACHTER, M.:
Kininogenase of the Guinea-Pig's Coagulating Gland and the Release of Bradykinin.
J. Physiol. 219:341 (1971).
137. MOYER, C.A.:
The Sociologic Aspects of Trauma with Particular Reference to Thermal Injury.
Am. J. Surg. 87:421 (1954).
138. MÜLLER-BERGHHAUS, G., HUTH, K., LASCH, H.G.:
Wirkung des Proteinaseinhibitors Trasylol bei der durch Liquoid induzierten disseminierten intravasalen Koagulation.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
139. NAKANO, I., KUSAKARI, T.:
Effect of Bradykinin and Eledoisin on the Regional Circulation.
Angiologie 17:333 (1965).
140. NEMIR, M.D.:
Studies on the Humeral Factor in Pulmonary Embolism.
Springer-Verlag, Berlin - New York (1967).
141. NEUHOF, H., LASCH, H.G.:
Schock, Mikrozirkulation und Hämostase.
Dtsch. med. Wschr. 38:1937 (1970).
142. NICOLAIDES, E.D., DE WALD, H.A., SHORBY, P.G., COLLIN, H.O.J.:
Synthesis and Biological Properties of a Special Octapeptid Related to Bradykinin.
Nature 187:773 (1960).

143. OLSSON, P., RADEGRAN, K., SWEDENBORG, J.:
Platelet Release Reaction.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 6,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1973).
144. PAAR, D., KÖNIG, E., FONK, J.:
Verbrauchskoagulopathie als Ursache hämorrhagischer
Diathese bei Malaria tropica.
Med. Welt 22:203 (1971).
145. PACK, G.T.:
The Pathology of Burns.
Arch. of Path. and Lab. Med. 1:767 (1926).
146. PALMER, A.A.:
Bibliotheca anat. (Basel) 9:300 (1967).
147. PANTLITSCHKO, M., GRUNDIG, E.:
Die proteolytische Wirkung des Thrombins.
Monatsh. für Chem. 88:253 (1957).
148. PARSONS, R. jr., ALRICH, E.M., LEHMANN, E.S.:
Studies on Burns: Experimental Study of the Effect
of Heparinization and Gravity on Tissue Loss Resulting
from Third-degree Burns.
Surg. Gynecol. Obstet. 90:722-724 (1950).
149. PAUSCHINGER, P., MATIS, P.:
Das Herzzeitvolumen bei Einhaltung absoluter Ruhe
und seine Beeinflussung durch Trasylol.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
150. PEARS, H.E., KINGSLEY, H.D.:
The Thermal Burns from the Atomic Bomb.
Surg. Gynecol. Obstet. 98:385-394 (1954).
151. PELTIER, L.F.:
Fat Embolism - a Current Concept.
Clin. and Related Research 66:241-253 (1969).
152. POPOV, S., DOHMEN, M., EGLI-BONN, H.:
Heparinbehandlung im hämorrhagisch-traumatischen
Schock.
Langenbecks Arch. Chir., Bd. 325 (Kongreßbericht).
153. POPOV, S., EGLI, H., DOHMEN, M.:
Therapie und Prophylaxe der disseminierten intravas-
kulären Gerinnung.
Med. Welt 20:2458 (1969).

154. POPOV-CENIC, S., EGLI, H.:
Reaktive Fibrinolyse und Proteinaseinhibition.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
155. POUYANNE, L., HONTON, J.L., CHEVAIS, R., SENEGAS, J.:
Les embolies graisseuses post-traumatiques.
Revue de Chirurgie orthopedique et reparatrice de
l'Appareil moteur.
Tome 3:56 (1970).
156. RAPAPORT, F.T.:
Heparin mindert Lungenkomplikationen nach schweren
Verbrennungen.
Ärztliche Praxis 25:3053 (1973).
157. RITTER, R.:
Das hämolytisch-urämische Syndrom, Behandlungsversuch
mit einem Proteinaseinhibitor.
Med. Welt 52:2790-2796 (1969).
158. ROCHA E SILVA, M.:
Kallikrein and Histamine.
Nature 145:591 (1940).
159. ROCHA E SILVA, M., BERALDO, W.T., ROSENFELD, G.:
Bradykinin.
Am. J. Physiol. 156:261 (1949).
160. ROSSITER, R.J.:
Carbohydrate Metabolism after Burning.
Quart J. of Exp. Phys. and Cognate Medical Sciences
32:279-300 (1944).
161. ROWLEY, D.A.:
Venous Constriction as the Cause of Increased Vascu-
lar Permeability Produced by 5-hydroxy-Tryptamine,
Histamine, Bradykinin and 48/80 in the Rat.
Brit. J. exp. Pathol. 45:56-67 (1964).
162. SAID, S.:
Some Respiratory Effects of Prostaglandines E2 and
E2d. Prostaglandine Symposium of the Worcester Foun-
dation for Experimental Biology.
New York, Interscience Publishers (1967).
163. SALDEEN, T.:
Zur Pathogenese des Mikroemboliesyndroms.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 6,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1973).

164. SALIBA, M.J.jr., DEMPSEY, W.C., KRUGGEL, J.L.:
Large Burns in Humans: Treatment with Heparin.
J. Amer. Med. Assoc. 225/3:261-269 (1973).
165. SANDRITTER, W.:
Pathologische Anatomie des Schocks.
Vortrag auf dem 16. Berliner Fortbild. Kongress
(1967).
166. SCHILDT, G., NILSSON, A.:
Standardised Burns in Mice.
Europ. Surg. Res. 2:23-33 (1970).
167. SCHÖNBORN, W., PRELLWITZ, W., SCHUSTER, H.P.,
BAUM, P., PEOPLAU, W., BRODERSEN, Ch.:
Verbrauchskoagulopathien bei exogenen Vergiftungen.
Dtsch. med. Wschr. 49:2478 (1970).
168. SCHORP, G.:
Dissertation, Medizinische Fakultät, München,
noch nicht veröffentlicht.
169. SCHÜTTERLE, G., MÜLLER-BERGHAUS, G., MÜLLER, K.,
GOUBEAUD, G.:
Renale Mikrozirkulation im Schock.
Die Niere im Schock, Thieme-Verlag, Stuttgart (1971).
170. SEALEY, J.E., GERTEN, J.N., LEDINGHAM, G.G.,
LAVAGH, J.H.:
J. Clin. Endokrin and Metab. 27:699 (1967).
171. SEKI, T., NAKAJIMA, T., ERDÖS, E.G.:
Colonkallikrein, its Relation to the Plasma Enzyme.
Bioch. Pharmacol. 21:1227 (1972).
172. SHOEMAKER, W.C.:
Shock: Chemistry,
Physiology and Therapy. Springfield (1967).
173. SLEEMAN, H.K., HARDAWAY, R.M.:
Evaluation of Biochemical Changes Associated with
Experimental Endotoxemia.
Surgery 61:915-950 (1967).
174. STRICK, G.:
Structure and Function of Biologically Active Pipti-
des: Bradykinin, Kallidin, and Congeners:
Ann. of the N.Y. Acad. of Sci. 104:52 (1963).
175. STENBERG, T., HOGEMAN, K.E.:
Experimental and Clinical Investigations on Liver
Function in Burns.
Ibid. 165:108 (1967).

176. STONE, H.H.:
Respiratory Burns: A Correlation of Clinical and Laboratory Results.
Ibid. 165:157 (1967).
177. STÜRMER, E.:
Synthesis and Biological Activity of Peptides Related to Bradykinin.
Experimentia 16:326 (1960).
178. STÜTTGEN, G.:
Enzymatic Formation of Active Polypeptides in the Human Skin.
Archiv Free University of Berlin, Department of Dermatology (1970).
179. TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E.:
Spektrophotometrische Bestimmung des Kallikrein und seiner Inaktivatoren.
Z. Physiol. Chem. 325:48 (1961).
180. TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E., HAENDLE, H., SEBENING, H., KALLER, H., HENNING, N., HEINKEL, K., SCHÖN, H.:
Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas.
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1964).
181. TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E., FRITZ, H., GROSS, R., KRONEBERG, G.:
Zur Biochemie des Trasylol.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 1,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1966).
182. ULMER, W.T.:
Bericht über Experimente an Hunden, die den Effekt von Trasylol im hämorrhagischen Schock betreffen.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
183. UMEZAWA, H.:
Enzyme Inhibitors of Microbial Origin.
University Park Press. Baltimore-London-Tokyo (1972).
184. UNDERHILL, F.P., CARRINGTON, G.L., APSINOW, R., PACK, G.T.:
Concentration Changes in Extensive Superficial Burns and their Significance for Systematic Treatment.
Arch. Intern. Med. 32:31-49 (1923).
185. UNDERHILL, F.P.:
Changes in Blood Concentration with Special Reference to the Treatment of Extensive Superficial Burns.
Am. Surg. 86:840 (1927).

186. VERTEL, R.M., KNOCHEL, J.P.:
Nonoliguric Acute Renal Failure.
J.A.M.A. 200:598 (May, 1967).
187. VOGEL, R., TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E.:
Natürliche Proteinase-Inhibitoren.
Thieme-Verlag, Stuttgart (1966).
188. WELLS, J.A., DRAGSTEDT, C.A., COOPER, J.A.,
MORRIS, H.C.:
Observations on the Antagonism between Heparin and
Trypsin.
Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med. 58:57
(1947).
189. WERLE, E.:
Über das Vorkommen von Kallikrein in den Speichel-
drüsen und im Mundspeichel.
Bioch. Z. 286:213 (1936).
190. WERLE, E.:
Über den Aktivitätszustand des Kallikreins der Bauch-
speicheldrüse und ihres äußeren Sekretes beim Hund.
Bioch. Z. 290:129 (1937).
191. WERLE, E., GÖTZE, W., KEPPLER, A.:
Über die Wirkungen des Kallikreins auf den isolierten
Darm und über eine neue darmkontrahierende Substanz.
Bioch. Z. 289:217 (1937).
192. WERLE, E., AMANN, R.:
Über Komplexe von Heparin mit Histamin und anderen
Di- und Polyaminen.
Klin. Wschr. 34:207 (1956).
193. WERLE, E., AMANN, R.:
Zum Wirkungsmechanismus des Heparins als Antithrombin
und zur Dynamik der Fibrinbildung.
Klin. Wschr. 35:22 (1957).
194. WERLE, E., APPEL, W., HAPP, E.:
Hemmkörper für Trypsin und Kallikrein im Blut der
Weinbergschnecke (*Helix pomatia*).
Arch. Exp. Path. and Pharmacol. 234:364 (1958).
195. WERLE, E., SCHAUER, A.:
Zur histochemischen Darstellung des Histamins der
Mastzellen.
Z. für exp. Med. 131:100 (1959).
196. WERLE, E., TRAUTSCHOLD, I.:
Bestimmung von Trasylol in Blut und Organen und seine
Verteilung nach Injektionen.
Münch. med. Wschr. 103:773 (1961).

197. WERLE, E., TRAUTSCHOLD, I., LEYSATH, G.:
Isolierung und Struktur des Kallidin.
Z. Physiol. Chem. 326:174 (1961).
198. WERLE, E., MARX, R., TRAUTSCHOLD, I.,
REICHENBACH-KLINKE, K.E.:
Einfluß der Proteinasen-Inhibitoren auf Fibrinolyse
und Blutgerinnung.
Blut 14:206 (1967).
199. WERLE, E., TRAUTSCHOLD, I., HAENDLE, H., FRITZ, H.:
Physiologic, Pharmacologic and Clinical Aspects of
Proteinase Inhibitors.
Ann. N.Y. Acad. of Sci. 146:464 (1968).
200. WERLE, E.:
Zur Biochemie des Trasylol.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 3,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1969).
201. WERLE, E.:
Trasylol, ein kurzer Überblick über Geschichte, Bio-
chemie und Wirkungen.
Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1971).
202. WEST, R.L., Jennings, P.B., HARDAWAY, R.M.,
LUNDBERG, E.A.:
Effect of Heparin on the Decrease in Blood Coagulation
Factor Activity Associated with Experimental
Endotoxemia.
Ann. Surg. 165:351-356 (1967).
203. WOLFF, W.A., ELKINGTON, J.R., RHOADS, J.E.:
Liver Damage and Dextrose Tolerance in Severe Burns.
Ann. Surg. 112:158 (1940).
204. WU, F.C., LASKOWSKI, M.:
Trypsin Inhibitor from Bovine Blood.
J. of Biol. Chemistry 235:1680 (1960).
205. WUNDERER, G., FRITZ, H., BRÜMMER, W., HENNRICH, N.,
ORTH, H.D.:
Biochem. Soc. Trans. 2:1324-1327 (1974).
206. WUNDERER, G., KUMMER, L., FRITZ, H., BÉRESS, L.,
MACHLEIDT, W.:
Broad Specificity Inhibitors from Sea Anemones.
Bayer Symposium V "Proteinase Inhibitors".
Springer-Verlag, Berlin - New York (1974).
207. WUNDERER, G., MACHLEIDT, W., WACHTER, E., BÉRESS, L.:
In Vorbereitung (1975).

208. WUNDERER, G.:
Dissertation, Techn. Universität München (1975).
209. WUNDERER, G., BÉRESS, L., MACHLEIDT, W., FRITZ, H.:
Methods in Enzymology.
Im Druck (1975).
210. WUNDERER, G., BÉRESS, L., MACHLEIDT, W., FRITZ, H.:
Protides of the Biological Fluids.
Im Druck (1975).
211. YIN, E.T., WESSLER, S.:
Heparin-accelerated Inhibition of Activated Factor X
by its Natural Plasma Inhibitor.
Biochimica et Biophys. Acta 201:387 (1970).
212. ZEITLIN, I.J.:
Advanced Exp. Med. Biol. 21:289 (1972).
213. ZIMMERMANN, W.E.:
Importance of Acid-Base Metabolism in Severe Burns
and During the Shock.
Physiopathologie et traitement des brûlures (Lorthioir)
Presses Academiques Européennes, p. 388-412.
Brüssel (1964).
214. ZWEIFACH, B.W.:
Functional Behavior of the Microcirculation.
Springfield (1961).

LEBENS BESCHREIBUNG

Geboren: Am 30. 7. 1947 in Wattenscheid

Eltern: Ernst Spelsberg - Industriekaufmann
Irmgard Spelsberg
geb. Hellmann - Sekretärin

Familienstand: Verheiratet

Ausbildungsweg:

1954 - 1958 Volksschule in Wuppertal-Ronsdorf

1958 - 1967 Städt. Hum. Gymnasium in
Wuppertal-Barmen, Siegesstraße

1967 - 1969 Grundwehrdienst und Wehrübung

1969 6 Monate elektrotechnisches Praktikum
im Werkzeug- und Automatenbau,
Firma Robert Koch, Wuppertal-Barmen

1969 - 1970 Studium der Elektrotechnik an der
Techn. Hochschule Darmstadt

1970 - 1976 Medizin-Studium an der
Ludwig-Maximilians-Universität, München
mit Staatsexamensabschluß

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle bin ich für die Überlassung des Themas und Ermöglichung meiner Arbeit zu Dank verpflichtet. Leider verstarb Herr Prof. Werle vor der Abfassung der Arbeit.

Herr Prof. Dr. H. Fritz erklärte sich freundlicherweise bereit, die weitere Betreuung der Arbeit zu übernehmen.

Herrn Dr. G. Engler danke ich sehr herzlich für die jederzeit freundliche und außergewöhnlich bereitwillige Unterstützung und die zahlreichen anregenden Vorschläge im Rahmen meiner Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch
Herrn Dipl. Chem. G. Wunderer für seine Hilfe bei der Isolierung des Seeanemoneninhibitors und
Herrn Dr. Remberger für die Auswertung der histologischen Organpräparate.

Die sorgfältige Haltung und Fütterung der Tiere übernahmen die Tierpfleger der Chir. Klinik Nußbaumstraße, denen ich hierfür meinen Dank aussprechen möchte.

Die Untersuchungen wurden ermöglicht durch Sach- und Personalmittel der Europäischen Gemeinschaft für Kohle und Stahl.

